

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Oktober 2003 (23.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/087405 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/04037

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. April 2003 (17.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 17 102.5 17. April 2002 (17.04.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: BRANDT, Burkhard, Hermann [DE/DE]; Peter-Hardt-Strasse 7, 48329 Havixbeck (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TIDOW, Nicola [DE/DE]; Lortzingstrasse 27, 48161 Münster (DE). SCHMIDT, Hartmut [DE/DE]; Albert Schweitzer Strasse 39, 49124 Georgsmarienhütte (DE). SEMJONOW, Axel [DE/DE]; Heroldstrasse 30, 48163 Münster (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR CHARACTERIZING PRIMARY TUMORS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON PRIMÄRTUMOREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying and characterizing primary tumors or individual areas of primary tumors, according to which cell clusters of tumor cells, which are contained in sample material, are isolated or enriched, whereupon genetic modifications of the isolated cell clusters are analyzed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung von Primärtumoren bzw. einzelner Bereiche von Primärtumoren, bei dem aus Probenmaterial darin befindliche Zellhaufen von Tumorzellen isoliert bzw. angereichert und anschließend genetische Veränderungen der isolierten Zellhaufen analysiert werden.

Verfahren zur Charakterisierung von Primärtumoren

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Charakterisierung von Primärtumoren bzw. einzelnen Bereichen hiervon aus dem peripheren Blut. Derartige Verfahren werden benötigt, um eine Einschätzung des Malignitätsgrades, der Invasivität bzw. des Metastasierungspotentials von Primärtumoren zu erstellen.

Derartige Verfahren werden für alle Arten von Tumoren, insbesondere für Mammakarzinome, Ovarialkarzinome, Kolonkarzinome, Magenkarzinome, Prostatakarzinome und Blasenkarzinome benötigt.

Das Prostatakarzinom (PCa) ist eines der häufigsten malignombedingten Todesursachen in der westlichen Welt. Nach prognostischen Kriterien lassen sich drei Typen des Prostatakarzinoms ableiten: (1) das kleine schmerzlose Karzinom, das während der Lebensspanne des Patienten nicht zu einem klinisch auffälligen oder metastasierenden Karzinom heranwächst; (2) das langsam wachsende Karzinom, das zu Beginn regionallymphatisch und erst spät in das

Skelett metastasiert; (3) das früh metastasierende Karzinom, das die ganze Prostata diffus befällt und unmittelbar in das Skelett metastasiert. Derzeit besteht nur für frühe, d.h. noch organbegrenzte Tumorstadien, die Möglichkeit einer kurativen Therapie. Hierfür stehen die radikale Prostatektomie oder Strahlenbehandlung zur Verfügung. Die optimale Behandlungsart ist jedoch noch Gegenstand der Diskussion. Etwa 15% der durch radikale Prostatektomie entfernten Prostatakarzinome zeigen Charakteristika wie bei asymptomatischen Autopsiebefunden und erscheinen relativ gutartig zu sein, d.h. organbegrenzt und gut differenziert bei kleinem Tumolvolumen. Obwohl der natürliche Verlauf dieser Karzinome noch nicht ausreichend bekannt ist, wird vermutet, daß diese Karzinome möglicherweise keiner Behandlung bedürfen. Etwa die Hälfte aller Prostatapräparate nach radikaler Prostatektomie zeigen jedoch einen höheren Anteil schlecht differenzierter lebensbedrohlicher Karzinome als dies an Hand der präoperativen Biopsien vorhersagbar wäre. Dies verdeutlicht damit die schlechte Vorhersagbarkeit des Malignitätsgrades, so daß die aktive Behandlung von klinisch als unbedeutend eingestuften Karzinomen möglicherweise doch die richtige Entscheidung sein könnte. Es fehlen Parameter, um vor einer Behandlung zwischen potentiell lebensgefährdenden Prostatakarzinomen und solchen mit relativ gutartigem oder sogar asymptomatischem Verlauf unterscheiden zu können.

Auch der klinisch etablierte Tumormarker PSA hat sich nicht als Metastasierungsmarker erwiesen. (Jhaveri et al. Urology 1999 Nov.;54(5):884-90; Pound et al. JAMA 1999 May 5;281(17):1591-7; Wolff et al. Eur Urol 1998;33(4):376-81). Inzwischen ist mit dem freien PSA ein weiterer Serumparameter verfügbar. Eine Verbesserung des Stagings der Patienten konnte damit jedoch nicht erzielt werden (Lin et al. Urology 1998 Sep;52(3):366-71).

Die RT-PCR zur Bestimmung der PSA mRNA ist inzwischen die am meisten verbreitete Methode zum Nachweis zirkulierender Prostatakarzinomzellen. Erste klinische Studien ergaben eine höhere diagnostische Sensitivität und Spezifität für das präoperative Staging mit Hilfe der PSA-RT-PCR im Vergleich zu bildgebenden Verfahren, PSA im Serum und histologischer Klassifikation (Katz et al., Cancer 75, 1642-1648, 1995). Die weiteren Studien zeigten, daß der PSA-mRNA-Nachweis bei ca. einem Sechstel der Patienten mit organbegrenztem Tumor (pT2) und etwa einem Viertel der Patienten mit extrakapsulärer Ausbreitung (pT3-Tumoren) positiv ist (Melchior et al. Clin Cancer Res 1997 Feb;3(2):249-56). Allerdings entwickelte nicht jeder Patient mit positivem PSA-mRNA-Nachweis eine progrediente Erkrankung.

Einen weiteren möglichen Parameter für das molekulare Staging stellt die mRNA des prostata-spezifische Membranantigen (PSMA oder PSM) dar (Israeli et al., J Urol. 153, 573-577, 1995). Bei PSA-negativen, anaplastischen Tumoren und Knochenmetastasen konnte eine hohe PSM-Expression nachgewiesen werden. Da die cDNA-Sequenz des PSM bekannt ist, konnten Studien mit der, RT-PCR zum Nachweis zirkulierender PSM positiver Zellen im peripheren Blut durchgeführt werden (Israeli et al., Cancer Res. 53, 227-230, 1993; Israeli et al. Cancer Res. 54, 1807-1811, 1994b; Israeli et al., J Urol. 153, 573-577, 1995; Loric et al. bestätigten mittels RT-PCR des PSM, daß eine hämatogene Aussaat von Prostatakarzinomzellen bereits bei lokal begrenzten Tumoren (pT2a und pT2b) stattfindet (Loric et al., Clin. Chem. 41, 1698-1704, 1995). In einigen Studien wurde eine höhere Sensitivität der PSM-RT-PCR gegenüber der PSA-RT-PCR bei prostatektomierten Patienten gefunden (Israeli et al., Cancer Res. 54, 1807-1811, 1994b. Andere Autoren berichten, daß der Marker bei metastasierenden Prostatakarzinomen weniger sensitiv war (Cama et al., J Urol. 153, 1373, 1995) und von falsch-positiven Ergebnissen der PSM-RT-PCR bei gesunden Kontrollpersonen (Lintula

et al., J Urol. 2, 155, 693A, 1996). Die klinische Relevanz auch der PSM-RT-PCR muß deshalb in weiteren Studien geklärt werden.

Ein komplementärer Parameter zum Nachweis der PSA-mRNA könnte die Bestimmung der mRNA des humanen glandulären Kallikrein (hK2) sein. Das Protein wird prostataspezifisch exprimiert und weist zum PSA eine Strukturhomologie von 80% auf. In der Studie von Corey et al. wurde nur bei einem Drittel der PSA-positiven Patienten auch ein positiver Nachweis für hK2 geführt, während bei 50% der für das hK2 positiven Proben die PSA-RT-PCR negativ waren (Corey et al., Urology 50, 184-188, 1997).

Neben den Problemen, die durch eine illegitime und eine physiologische, aber nicht tumorspezifische, Expression von Genen, entstehen, kann von der biologische Rationale her festgestellt werden, daß der Nachweis zirkulierender Tumorzellen mittels RT-PCR der mRNA von organspezifischen Markern der Prostata keine Aussagen über die Anzahl der Zellen und ihre Fähigkeit zu metastasieren erlaubt. Deshalb ergibt sich die Notwendigkeit, nach weiteren molekularen Markern zu suchen.

Insgesamt fehlen also prognoserelevante Parameter, die präoperativ den Typ des Karzinoms erkennen lassen. Deshalb bleibt die Kontroverse über den Sinn der Frühdagnostik und den Stellenwert der operativen Therapie des Prostatakarzinoms bestehen. Damit bleibt auch die Frage nach der Fähigkeit der Prostatakarzinomzellen zu metastasieren, denn 20% der Patienten mit organbegrenztem Karzinome und negativem Knochenszintigramm bekommen Metastasen trotz der völligen operativen Entfernung des Primärtumors. Andererseits werden 50% der Patienten mit einem operablen Prostatakarzinom voraussichtlich nicht an ihrem Karzinom sterben.

Ausgehend von diesem Stand der Technik stellt sich die vorliegende Erfindung die Aufgabe, ein Verfahren zur Charakterisierung von Primärtumoren bzw. einzelner Bereiche von Primärtumoren zur Verfügung zu stellen, mit dem ein zuverlässiges Staging und eine zuverlässige Prognose der Tumoren bestimmt werden kann.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach Anspruch 1 und die Verwendungen nach Anspruch 15 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den abhängigen Ansprüchen sowie den auf Verwendungen des erfindungsgemäßen Verfahrens gerichteten Ansprüchen gegeben.

Das vorliegende erfindungsgemäße Verfahren beruht vorteilhafterweise auf der Analyse kurzer einfacher repetitiver Sequenzen, der DNS, insbesondere aber nicht ausschließlich so genannter Microsatelliten-DNS.

Es gilt als wissenschaftlich anerkannt, dass die Bildung und Ausbreitung von malignen Tumoren mit einer Akkumulation von multiplen genetischen Veränderungen, die z.B. Gene der Zellzykluskontrolle oder der Zelldifferenzierung betreffen, verbunden ist. Kurze polymorphe DNS-Sequenzen, angefangen bei einer Base Länge, können als empfindliche Marker dieser Veränderungen dienen. Eine sehr gut untersuchte Gruppe dieser polymorphen Sequenzen sind die sogenannten Mikrosatelliten, die aus 10 bis 60 repetitiven Sequenzen von 2 bis 5 Basenpaaren bestehen und eine Länge von < 1 kb haben. Hierzu gibt es eine vielfältige Literatur. Loeb L.A., Cancer Res. 51:3075-3079, 1991; Fearon E.R., Vogelstein B. Cell 61:759-767, 1990; Peltomaki P. et al., Science 260:810-812, 1993; Isaacs, W. B. Carter, B. S. Cancer Survival 11: 15-24, 1991; Kunimi, K. et al., Genomics, 11: 530-536, 1991; Suzuki, H.; Komiya, A.; Aida, S.; Akimoto, S.; Shiraishi, T.; Yatani, R.; Igaraishi, T.; Shimazaki, J., Cancer Res., 6: 956-61, 1995; Uchida, T. et al., Oncogene 10: 1019-1022, 1995; Berthon,

P. et al., Br. J. Cancer 72: 946-51, 1995; Carter, B. S. et al., PNAS 87: 8751-5, 1990; Egawa, S. et al., Cancer Research 55: 2418 - 2421, 1995; MacGrogan, D. et al., Genes, Chromosomes and Cancer 10: 151-9, 1994; Macoska, J. A. et al., Cancer Research 54: 3824 - 3830, 1994; Bova, G. S. et al., Cancer Research 53: 3869 - 3873, 1993; Gao, X. et al., Cancer Research, 55: 1002 1005, 1995; Macoska J A et al., Cancer Research 55: 5390 - 5395, 1995; Suzuki H et al. Genes, Chromosomes and Cancer, 13: 168-74, 1995; Trapman J et al., Cancer Research, 54: 6061 - 6064, 1994; Vocke C D et al., Cancer Research, 56: 2411 - 2416, 1996; Cheng L et al., J Nad Cancer Inst 1998 Feb 4;90(3):233-7; Takimoto Y et al., Cancer 2001 Jan 15;91(2):362-70.

Erfindungsgemäß werden nun Alterationen derartiger Mikrosatelliten-DNS untersucht und so unter Zuhilfenahme der Darstellung genetischer Veränderungen ein Nachweis, eine Charakterisierung, Quantifizierung und eine Prognoseabschätzung für Tumoren durchgeführt. Dabei können Tumoren dahingehend charakterisiert werden, ob sie proliferativ, nicht-proliferativ oder apoptotisch sind. Der Malignitätsgrad, die Invasivität, beispielsweise bezüglich Organüberschreitung, und Metastasierung können aufgrund des erfindungsgemäßen Verfahrens durch die Genotypisierung von Zellen aus Zellhaufen bestimmt werden. Insbesondere können beispielsweise aus Blutproben isolierte Tumorzellen einzelnen Bereichen eines multifokalen Tumors zugeordnet werden, d.h. ihre Klonalität bestimmt werden. Über ein derartiges Grading ist eine Prognoseeinschätzung und eine Feinklassifizierung der Primärtumoren möglich.

Dies ist insbesondere möglich, wenn Zellhaufen von Tumorzellen aus Blutproben, Nippleaspiratflüssigkeit der weiblichen Brust, Urin- oder Gewebeproben isoliert werden.

Als besonders vorteilhaft hat sich die Analyse der Mikrosatelliten herausgestellt, die im Anspruch 4 angegeben

sind. Für einige dieser Mikrosatelliten wurden wie in Anspruch 6 angegeben, eine Multiplex-PCR zur Amplifikation der DNS entwickelt, wobei insbesondere durch die Auswahl der Mikrosatelliten und der wie in Anspruch 8 angegebenen Primer für die Multiplex-PCR bewirkt wird, daß die Mikrosatelliten jedes Multiplex-PCR-Ausatzes über möglichst viele Chromosomen verteilt sind und die Menge der amplifizierten Fragmente sich zwischen den einzelnen Mikrosatelliten derart unterscheiden, daß eine Auftrennung, beispielsweise mittels anschließender Kapillarelektrophorese, problemlos möglich ist.

Die Trennung und Auswertung der PCR kann beispielsweise auf einem automatisierten System, wie beispielsweise dem ABI Prism 310 Genetic AnalyzerTM erfolgen. Reproduzierbare Amplifikationsmuster sind dabei in einem Konzentrationsbereich von 100 ng bis herab zu 1 ng eingesetzter DNS möglich. Die untersuchten genomischen Alterationen der Mikrosatelliten-DNS betreffen zum einen den sogenannten LOH-Wert (Loss Of Heterozygosity) und zum anderen den RER-Wert (Replikationsfehler).

Für die Berechnung des Loss of Heterozygosity (LOH) wird die publizierte Formel Canzian et al. Cancer Res 1996 Jul 15;56(14):3331-7

$$\text{LOH Score} = \frac{\text{Peakfläche Allel 2 Tumor} \times \text{Peakfläche Allel 1 Normalgewebe}}{\text{Peakfläche Allel 1 tumor} \times \text{Peakfläche Allel 2 Normalgewebe}}$$

verwendet. Die Formel basiert auf Untersuchungsergebnissen, die mit einem analogen genetischen Analysesystem ermittelt wurden. In die Berechnung geht das Verhältnis der Peakflächen der Allele in einem Lauf ein. In Tabelle 1 ist am Beispiele des Markers D13S153 gezeigt, daß die Quotienten der Peakflächen mit niedrigem Variationskoeffizienten bestimmbar sind. Damit erlauben die erfindungsgemäßen Multiplex-PCR-Protokolle eine reproduzierbare und sensitive Bestimmung eines LOHs.

sind. Für einige dieser Mikrosatelliten wurden wie in Anspruch 6 angegeben, eine Multiplex-PCR zur Amplifikation der DNS entwickelt, wobei insbesondere durch die Auswahl der Mikrosatelliten und der wie in Anspruch 8 angegebenen Primer für die Multiplex-PCR bewirkt wird, daß die Mikrosatelliten jedes Multiplex-PCR-Ausatzes über möglichst viele Chromosomen verteilt sind und die Menge der amplifizierten Fragmente sich zwischen den einzelnen Mikrosatelliten derart unterscheiden, daß eine Auftrennung, beispielsweise mittels anschließender Kapillarelektrophorese, problemlos möglich ist.

Die Trennung und Auswertung der PCR kann beispielsweise auf einem automatisierten System, wie beispielsweise dem ABI Prism 310 Genetic AnalyzerTM erfolgen. Reproduzierbare Amplifikationsmuster sind dabei in einem Konzentrationsbereich von 100 ng bis herab zu 1 ng eingesetzter DNS möglich. Die untersuchten genomischen Alterationen der Mikrosatelliten-DNS betreffen zum einen den sogenannten LOH-Wert (Loss Of Heterozygosity) und zum anderen den RER-Wert (Replikationsfehler).

Für die Berechnung des Loss of Heterozygosity (LOH) wird die publizierte Formel Canzian et al. Cancer Res 1996 Jul 15;56(14):3331-7

$$\text{LOH Score} = \frac{\text{Peakfläche Allel 2 Tumor} \times \text{Peakfläche Allel 1 Normalgewebe}}{\text{Peakfläche Allel 1 tumor} \times \text{Peakfläche Allel 2 Normalgewebe}}$$

verwendet. Die Formel basiert auf Untersuchungsergebnissen, die mit einem analogen genetischen Analysesystem ermittelt wurden. In die Berechnung geht das Verhältnis der Peakflächen der Allele in einem Lauf ein. In Tabelle 1 ist am Beispiele des Markers D13S153 gezeigt, daß die Quotienten der Peakflächen mit niedrigem Variationskoeffizienten bestimmbar sind. Damit erlauben die erfindungsgemäßen Multiplex-PCR-Protokolle eine reproduzierbare und sensitive Bestimmung eines LOHs.

Tabelle 1: Vergleich der Quotienten für die
Allele 1 und 2 bei MCF-7-Zellen

PCR-Nr.	D13S153 A1	D13S153 A2	Quotient A1/A2
1	9227	11393	0,8
2	5593	6431	1,14
3	7663	8315	0,92
4	13123	12544	1,04
5	9674	10576	0,91
6	9538	9405	1,01
7	11847	11137	1,06
8	8240	7896	1,04
9	11125	12090	0,92
10	12197	11325	1,07

Mittelwert 0,991

Standardabw. 0,10082438

In die Berechnung eines "replication errors" (RER) geht auch die Länge der Fragmente über einen Faktor ein, der den Schwerpunkt der Peakverteilung repräsentiert.

Die untere Nachweisgrenze bei der Multiplex-PCR mit drei Primerpaaren wurde sowohl an DNA aus den Zelllinien SK-BR-3 und LNCaP als auch an Patienten-DNA (Vergleich Tumor-DNA Leukozyten-DNA) bestimmt. Ein reproduzierbares Bandenmuster wurde für alle polymorphen Marker bis zu einer Konzentration von > 1 ng DNA erzielt. Das entspricht einer Zahl von ca. 50 Zellen.

Vorteilhafterweise werden die zu untersuchenden Tumorzellen aus einer Probe, beispielsweise einer Blutprobe, isoliert bzw. angereichert, in dem zuerst mittels Dichtegradienten-Zentrifugation epitheliale Zellen angereichert werden und anschließend eine immunomagnetische Isolierung bzw. Anreicherung Zytokeratin-positiver und/oder PSA-

positiver Zellhaufen durchgeführt wird. Hierzu werden magnetische Beads verwendet, an die entsprechende Antikörper gebunden sind. Die Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgt dabei vorteilhafterweise wie in Brandt und Griwatz, Clin. Chem. 42, Nr. 11 1996, S. 1881-1882 beschrieben. Diese Druckschrift wird hiermit bezüglich ihres gesamten Offenbarungsgehaltes in die vorliegende Anmeldung aufgenommen. Die immunomagnetische Zellisolierung erfolgt vorteilhafterweise wie in Griwatz et al., J. Immunol. Meth. 183, 1995, S. 251-265 beschrieben. Auch als Primärantikörper wurden die folgenden Antikörper verwendet: rabbit-mouse anti-PSA, mouse anti-Zytokeratin-biotinyliert, mouse anti-cFas, mouse anti-M30, mouse anti-Mib1 und mouse anti-H1/H3-Histonproteine und als Sekundärantikörper die folgenden Antikörper: anti-rabbit und anti-mouse mit Alexa-488 und -594 oder FITC, Cy5, Cy3, RPE, markiert.

Entscheidend bei der vorliegenden Isolierungsmethode ist dabei, daß für das molekulare Staging letztlich nur Zellhaufen ausgewertet werden, die durch das genannte Verfahren isoliert werden. Als besonders vorteilhaft hat sich dabei herausgestellt, wenn während der Dichtegradienten-Zentrifugation mit hyperosmolaren Medien gearbeitet wird. Dadurch schrumpfen die Zellen der Zellenhaufen, so daß bei der anschließenden immunomagnetischen Zellisolierung die verwendete Säule nicht durch die Zellhaufen verstopft wird. Dies führt zu einer erheblich erhöhten Ausbeute an Tumorzellen aus der Blutprobe, so daß fast ausschließlich Tumorzellen auf dem Objektträger zu finden sind.

Es stellte sich heraus, daß nach diesem Verfahren isolierte Zellen überwiegend als Zellhaufen vorliegen, die positiv auf den Nachweis von PSA und Zytokeratin sind. Alle Patienten mit einem Prostatakarzinom wiesen derartige Zellhaufen auf, während die Kontrollproben für den Nachweis derartiger Zellen negativ waren. Die Größe der Haufen reicht dabei von 2 bis 70 Zellen, wobei die Anzahl

der Haufen in 20 ml peripherem Blut zwischen 1 und 5400 betrug. Allerdings weisen etwa 90 % der Patienten mehr als 100 Zellen auf (und damit wird die Nachweisgrenze überschritten).

Es konnten aufgrund der Zellmorphologie und der Kernfärbung prinzipiell zwei Klassen von Zellhaufen unterschieden werden. In großer Zahl wurden Haufen bestehend aus dysmorphen Zellen gefunden. In einzelnen Fällen waren in diese kleine runde kernhaltige Zellen eingeschlossen. Daneben wiesen 25 der untersuchten 74 Patienten mit Prostatakarzinom Haufen auf, die nur aus kleinen, ca. 5 bis 7 μm Durchmesser aufweisenden, runden und kernhaltigen Zellen bestanden. Die meisten der Patienten (ca. 60 %) hatten weniger als 10 derartige Zellhaufen in 20 ml Blut nachweisbar. In drei Fällen waren jedoch bis zu 200 derartige Zellhaufen nachweisbar.

Beide Gruppen von Zellhaufen unterscheiden sich bezüglich ihres Nachweises auf die Apoptosemarker c-Fas und M30, sowie die Proliferationsmarker Mib-1 und H1/H3. Die dysmorphen Zellhaufen waren für die Marker cFas und M30 positiv, während die Gruppe der kleinen, runden, kernhaltigen Zellhaufen negativ war.

Fig. 1 zeigt in Teilbild A den Zelldurchmesser, bevor die Zellen durch Suspension in einen hyperosmolaren Puffer für die Dichtegradienten-Zentrifugation suspendiert wurden. Der Zelldurchmesser beträgt dabei im Durchschnitt 8,02 μm . Fig. 2B zeigt demgegenüber den Zelldurchmesser nach Aufnahme in einen hyperosmolaren Puffer wie Nycoprep bzw. Polymorphprep. Der Durchschnittsdurchmesser verringerte sich hierbei auf 4,97 μm .

Im Folgenden wird die Zellisolierung beispielhaft für verschiedene Zell- und Tumortypen angegeben.

I. Isolierung von Zellen aus einem Mamma- bzw. Ovarial-

karzinom

A: Proben-Vorbereitung

1. Es werden Zellsuspension des Tumors, wie nach dem Verfahren in V. beschrieben, präpariert. Eine wie unter V. beschrieben aus einem Mamma- bzw. Ovarialkarzinom isolierte Zellsuspension wird 10 min bei Raumtemperatur (RT) in PABB-Puffer inkubiert (sättigt Bindungsstellen ab),
2. zentrifugieren (10 min, 1500 rpm)
3. in 1000 μ l PABB-Puffer resuspendieren, mindestens 30 min bei RT auf Schüttler inkubieren,
4. 20 μ l ErbB-2-Antikörper (Ab-2, anti-mouse gegen menschliches ErbB-2) hinzufügen, mindestens 30 min bei RT inkubieren,
5. 2 ml 1 % PBS/BSA hinzufügen, mischen und zentrifugieren. In 70 μ l PABB-Puffer resuspendieren und ca. 15 min bei RT inkubieren,
6. 10 μ l an Magnetkügelchen gekoppelte Antikörper (IgG1 Kaninchen gegen Maus-Antikörper, 1:10-Verdünnung) dazugeben, mindestens 30 min bei RT inkubieren (20 μ l für 10^7 Zellen, Inkubationsvolumen 80 μ l)
7. mit 1 ml PABB-Puffer waschen, abzentrifugieren (10 min, 1500 rpm)
8. in 500 μ l 1 % PBS/BSA resuspendieren

B: Säule

MS-Säulen (Miltenyi Biotec GmbH), Kapazität 10^7 Zellen verwenden

1. Säule mit 500 μ l 1 % PBS/BSA waschen
2. Die mit 1 % PBS/BSA verdünnte Zellsuspension (s. Punkt I A) auf die Säule geben und die Negativfraktion auffangen, anschließend die Säule mit 1,5 ml 1% PBS/BSA spülen und ebenfalls auffangen.
3. mit Hilfe einer 10 ml Einwegspritze und eines darauf installierten Dreiwegehahns blasenfrei ca. 3 ml PBS/BSA von unten durch die Säule spülen, so daß Zellen erneut die Säule passieren können. Wiederum als Negativkontrolle auffangen. Falls die 1. Säule verstopft, d.h. die Fließgeschwindigkeit geringer wird, sofort die Säule mit PBS/BSA von unten durchspülen und das übrige Probenmaterial auf eine neue Säule geben.
4. Um die Positivfraktion aufzufangen, die Säule vom Magneten entfernen und auf ein weiteres 10 ml-Röhrchen setzen.
5. Die Säule mit 1 ml 1 % PBS/BSA ausspülen und die Fraktion auffangen, anschließend erneut die Säule mit 1 ml 1 % PBS/BSA füllen und mit dem Stempel die Positivfraktion durch die Säule drücken

C: Zytospins

1. Die Fraktionen werden abzentrifugiert und in 1 % PBS/BSA resuspendiert
2. Zytospins (8 min, 400 rpm) von positiven und negativen Fraktionen anfertigen

3. Zellpunkt auf Zytospin mit Fett-Stift markieren, 20 min mit 4% PFA fixieren, anschließend 2 x 5 min mit 1 % PBS/BSA waschen, bei 4 °C in feuchter Kammer aufbewahren
- II. Isolierung von Tumorzellen aus Blutproben zur Zellcharakterisierung von Mamma- und Ovarialkarzinomen
 1. Gradiententrennung wie unter III.1 beschrieben
 2. Probenvorbereitung der angereicherten Tumorzellen wie unter I.A beschrieben, wobei von dem unter II.1. hergestellten Zellpellet ausgegangen wird.
- III. Isolierung von Tumorzellen aus Blutproben zum Nachweis und zur Zellcharakterisierung von Prostata, Blasen-, Kolon- oder Magenkarzinomen

Hierzu werden die nachfolgend genauer erläuterten Schritte durchgeführt:

1. Gradiententrennung mit Polymorphprep und Nycoprep
 2. Magnetische Zellseparation
 - a) Vorbereitung
 - b) Säulen
 3. Cytospins für die Färbung
 4. Färbung
-
- 1: Gradiententrennung (hier beispielhaft Zentrifugation mit Prostata-Ca-Patientenblut)
 - a) 3ml Polymorphprep (Gradient) vorlegen (Dichte 1.113, Fa. Nycomed)

- b) mit 3ml Nycoprep (Gradient) vorsichtig überschichten (Dichte 1.068)
 - c) ohne Durchmischung mit 4 ml EDTA-Patientenblut überschichten
 - d) zentrifugieren (30 min, 1500 rpm)
 - e) Serum abpipettieren (gleichmäßig verteilen)
 - f) Monozytenfraktion incl. Tumorzellen (M) sowie die Leukozytenfraktion (L) in PP-Röhrchen bringen, auf insges. ca. 4 PP-Röhrchen verteilen, anschließend mit der doppelten Menge PBS pH 7,4 mischen (waschen), abzentrifugieren (20 min, 1500 rpm), Überstand verwerfen
 - g) Erythrozytenfraktion verwerfen
 - h) Monozytenpellet mit insgesamt 2-5 ml PFA (Paraformaldehyd in PBS) 4% fixieren
 - i) Leukozytenpellet in insgesamt 1 ml PBS aufnehmen und in 2 Eppendorfcups überführen (sammeln)
 - j) abzentrifugieren (Epifuge, 10 min, 1500 rpm, Überstand verwerfen, Eisfach (- 20 °C))
2. Magnetische Zellseparation mit Mikrobeads zur Anreicherung von Tumorzellen

Im folgenden wird immer nur mit dem Pellet weitergearbeitet, der Überstand wird nach jedem Waschvorgang verworfen.

Vorbereitung:

- a) das mit PFA (Paraformaldehyd) verdünnte Pellet abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- b) Dilutionspuffer 1x (Waschpuffer PBS/BSA) vorbereiten (36 ml H₂O_{dest} + 4 ml Dilutions Buffer 10 x = Dilutionspuffer 1 x)
- c) Pellet in 5 ml PBS/BSA aufnehmen, dann in 35 ml Dilutionspuffer aufnehmen/Konzentration: 1 g/100 ml, anschließend 5 ml Permeabilisierungslösung für Zellen (P-Lsg) dazu geben (Permeabilisierung), 5 min stehen lassen, vorher 1-2 x schwenken (sonst evtl. Zellen kaputt), auf drei 15 ml-PP-Röhrchen (Greiner Cell Star) verteilen, zentrifugieren (10 min, 1200 rpm) ohne Bremse, Überstand verwerfen.
- d) 5 ml Fixierungslösung für Zellen (F-Lsg) + 45 ml PBS (= Markierungslösung), 30 ml abnehmen, davon 1-5 ml zum resuspendieren des Pellets verwenden, mit den restlichen 25 ml resuspendieren, umfüllen in zwei 15 ml-PP-Röhrchen, zentrifugieren (10 min, 1200 rpm), Überstand verwerfen
- e) Pellet in 10 ml Fixierungs-Lösung resuspendieren, erneut zentrifugieren (10 min, 1200 rpm), Überstand verwerfen
- f) Pellet in 600 µl Fixierungs-Lösung resuspendieren
- g) 200 µl Blockierungsreagenz für (PABB) dazugeben und mischen
- h) 200 µl Immunomagnetische Kügelchen (z.B. MACS Bead[®] anti-mouse-AK oder beispielsweise auch anti-rabbit,

-goat, -sheep, -pig (Kaninchen, Ziege, Schaf, Schwein) dazugeben und mischen (Cytokeratin-Markierung für die Färbung

- i) 45 min inkubieren bei RT
- j) 4 ml Fixierungs-Lösung dazu geben, mischen, zentrifugieren (10 min, 1200 rpm), Überstand verwerfen
- k) Pellet in ca. 1 ml PBS/BSA aufnehmen, zum Aufheben fixieren in ca. 1 ml PFA 4%

Magnetseparation

- l) die in 4% PFA-fixierte Monozytenfraktion (incl. Tumorzellen) zentrifugieren, 10 min 1200 rpm Überstand verwerfen
- m) die Säule mit 3 ml PABB absättigen (spülen von oben mit Pipette)
- n) das Pellet zunächst in mindestens 12 ml PBS/BSA (je nach Pelletgröße individuell anpassen) aufnehmen (waschen), dabei schrittweise verdünnen, anfangen mit 3 ml im PP-Röhrchen, dann durchmischen, anschließend nach und nach auf die Säule geben (weitere Verdünnung also direkt auf die Säule), dabei die Negativfraktion als Negativkontrolle auffangen. Die Fließgeschwindigkeit muß konstant bleiben!
- o) mit Hilfe einer 10 ml Einwegspritze und eines darauf installierten Dreiwegehahns blasenfrei ca. 3 ml PBS/BSA von unten durch die Säule spülen, so daß Zellen erneut die Säule passieren können. Wiederum als Negativkontrolle auffangen. Falls die 1. Säule verstopft, d.h. die Fließgeschwindigkeit geringer wird, sofort die Säule mit PBS/BSA von unten durchspülen und das übrige Probenmaterial auf eine neue

Säule geben.

- p) die Säule mit weiteren 5-10 ml PBS/BSA nach und nach spülen und in der Negativkontrolle auffangen (alle Negativzellen sollten jetzt runtergespült worden sein. Die Positivzellen sollten dagegen in der Säule hängengeblieben sein. Sie sind durch die Bindung eines anti-Zytokeratin-Antikörpers und eines magnetisierbaren Kügelchens magnetisierbar geworden.
- q) bei langsamer Durchlaufgeschwindigkeit die Säule erneut von unten mit PBS/BSA durchspülen
- r) die Säule vorsichtig aus dem Magneten nehmen und zunächst ohne Stempel die Positivfraktion (+) mit 5-6 ml PBS/BSA ausspülen
- s) erneut die Säule mit 3-4 ml PBS/BSA füllen und mit dem Stempel die Positivfraktion (++) durch die Säule drücken

PABB: 5 ml AB-Serum 10% (v/v) + 50 μ l BSA-C 0,1% (v/v) + 45 ml PBS

PBS/BSA: 1 g BSA auf 100 ml PBS, pH 7,4 = \rightarrow 1% (v/v)

0,1 % Triton: Triton X100 mit PBS pH 7,4 1:1000 verdünnen,

In der Regel ist im Vergleich in der ersten Positivfraktion (+) das Verhältnis Tumorzellen/Monozyten deutlich verschoben, häufig finden sich nur noch einzelne Monozyten und damit ein hoher Reinheitsgrad der Tumorzellen.

- t) Abzentrifugieren und Zellpellet in 1-2 ml PBS aufnehmen

3. Cytospins für die Färbung

- a) 200 μ l verdünnte Probe/Spin auf Objektträger aufbringen (Pipette, Filter, Trichter, leere Referenz): +- und ++-Kontrollen auf einen Objektträger, Negativ (-) -Kontrolle auf einen weiteren Objektträger aufbringen, jeweils zwei von jedem zur Kontrolle, falls die Färbung nicht funktioniert, Objektträger beschriften (+, ++, -, Datum, Name Patient, vor Mgnetseparation)
- b) Zentrifugieren 8 min, (400 Umdrehungen)
- c) Spot mit Fettstift umzeichnen, Zellen auf Objektträger werden mit 30 μ l PFA/Spot für ca. 20 min fixiert.
- d) 10 min mit 30 μ l pro Spin mit PBS/BSA waschen, abklopfen, bei 4 °C aufbewahren
- e) die restlichen verdünnten Proben abzentrifugieren (10 min, 1000 rpm), Überstand verwerfen, Pellet zur Fixierung in ca. 2 ml PFA aufnehmen und bei 4 °C aufbewahren

4. Färbung (mit Streptavidin, mit Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert Alexa-488/584, FITC, RPE etc.)

- a) die fixierten Pellets auf dem Objektträger (s. letzter Punkt in 3. Cytospin) mit 0,1% Triton pro Spin für 10 min in Feuchtekammer permeabilisieren
- b) 20 min mit PABB absättigen
- c) 15 μ l sekundärer Antikörper (Alexa 594 Streptavidin) pro Spin für 30 min (verdünnen 1:100 mit PABB in Eppendorf, z.B. 396 + 4/99 + 1 etc.), abklopfen

- d) 2 x je 5 min (oder 1 x 10 min) mit 30 μ l PBS/BSA pro Spin waschen, abklopfen
- e) 20 min mit 20 μ l PABB absättigen, abklopfen
- f) 45 min versetzen mit 15 μ l PSA (Antikörper DP033, verdünnen 1: 100), abklopfen
- g) waschen mit PBS 10 min
- h) 30 min mit 15 μ l sekundärer Antikörper (Alexa 488 goat anti rabbit 11008, verdünnen 1: 100) inkubieren, abklopfen
- i) waschen mit PBS 10 min
- j) 30 min waschen mit 30 μ l H₂O_{bidest}, abklopfen

IV. Isolierung von Zellen eines Tumors aus Urinproben

Hierzu wurden die nachfolgend genauer erläuterten Schritte durchgeführt:

1. Urinproben nehmen
2. Dichtebestimmung, Mengenbestimmung (ml), zentrifugieren und Pelletgröße bestimmen
3. Cytospins für die PAP-Färbung
4. PAP-Färbung
5. ggf. Magnetseparation
 - a) Vorbereitung
 - b) Säulen
6. Cytospins für die Antikörper-Färbung

7. Cytokeratin-Färbungen

1. Probennahme

2. Dichtebestimmung, Mengenbestimmung

- a) Urin in PP-Röhrchen umfüllen
- b) Urin in Messzylinder umfüllen, Dichte bestimmen, extra protokollieren
- c) Zentrifugieren in PP-Röhrchen (10 min bei 1.000 Umdrehungen = rpm), Überstand verwerfen
- d) Pelletgröße schätzen
- e) zum Aufbewahren Pellet in ca. 2 ml PFA aufnehmen (fixieren) je nach Größe des Pellets auch mehr PFA

3. Cytospins für PAP-Färbung

- a) Pellet mit PBS/BSA verdünnen (keine Trübung), mit ca. 3 ml je nach Größe des Pellets, anfangen
- b) 200 μ l verdünnte Probe/Spin auf Objektträger aufbringen (Pipette, Filter, Trichter)
- c) Zentrifugation 8 min, (400 U/min) 2 x g
- d) Spin anschauen, ob die Zellen einzeln auf dem Objektträger liegen, sonst Probe weiter verdünnen und c) wiederholen
- e) Zellen auf Objektträger fixieren (Fettstift großzügig umkreisen), 30 μ l PFA/Spin (Pipette) für ca. 20 min (Deckel zu), abklopfen, kühl lagern oder weitergeben (Punkt 4)

- f) die restlichen verdünnten Proben abzentrifugieren (10 min, 1000 rpm), Überstand verwerfen, Pellet zur Fixierung in ca. 2 ml PFA (Paraformaldehyd+Formalin) aufnehmen und aufbewahren bei 4 °C

PFA: Paraformaldehyd + 37 % Formalin 1:10 oder mit PBS verdünnen

PBS/BSA: 1 g BSA (Bovine Albumine)/100 ml PBS

4. PAP-Färbung und erste Charakterisierung (Kontrollfärbung)

- a) Zellen auf dem Objektträger nach Paparicolaau färben oder andere Kontrollfärbungen

5. Magnetassoziierte Zellsortierung mit magentisierbaren Mikrobeads korrigiert auf Anti-Maus-Antikörper

Immer nur mit dem Pellet arbeiten, Überstand nach jedem Waschvorgang verwerfen!

Vorbereitung

- a) das mit PFA verdünnte Pellet abzentrifugieren, Überstand verwerfen, 2 ml/PBS/BSA zum Pellet geben, zentrifugieren (7 x g 10 min, ca. 900 rpm), Überstand abheben
- b) Dilutionspuffer 1x (Waschpuffer) vorbereiten (36 ml H₂O_{dest} + 4 ml Dilutions Buffer 10 x = Dilutionspuffer 1 x)
- c) Pellet in 5 mL PBS/BSA aufnehmen, dann 35 mL Dilutionspuffer dazugeben, anschließend 5 mL P-Lösung dazu, 5 min stehenlassen, vorher 1-2 x schwenken, auf drei 15 ml-PP-Röhrchen (z.B. Greiner Cell Star) verteilen, zentrifugieren

(10 min, 900 rpm), Überstand verwerfen

- d) 5 ml F-Lösung (entspricht PABB, + 45 ml PBS (= Markierungslösung)), 30 ml abnehmen, davon insgesamt 1-5 ml zum Auflösen des Pellets verwenden, in ein Röhrchen bringen, dann mit den restlichen 25 ml suspendieren, umfüllen in zwei 15 ml-PP-Röhrchen, zentrifugieren (10 min, 900 rpm), Überstand verwerfen
- e) Pellet in insgesamt 10 ml F-Lösung resuspendieren, erneut zentrifugieren (7 x g 10 min, 900 rpm), Überstand verwerfen
- f) Pellet in 500-1000 μ l (Minimum: 200 μ l) verdünntem Cytokeratin 7 aufnehmen (1:50 mit PABB verdünnen (z.B. 490 μ l PABB + 10 μ l Zytokeratin 7), 30 min inkubieren, zentrifugieren (10 min, 900 rpm 7 x g), Überstand abheben
- g) mit 5-10 ml PABB waschen, zentrifugieren (10 min, 900 rpm), Überstand verwerfen
- h) Pellet in 600 μ l F-Lösung resuspendieren
- i) 200 μ l FCR-Blockierungs-Reagenz unverdünnt dazugeben und mischen
- j) 200 μ l magnetisierbare Mikro-Beads konjugiert mit Anti-Maus-Antikörper unverdünnt dazugeben und mischen
- k) 45 min inkubieren bei Zimmertemperatur
- l) 4 ml F-Lösung dazu geben, mischen, zentrifugieren (10 min, g 900 rpm), Überstand verwerfen
- m) Pellet in ca. 1 ml PBS/BSA aufnehmen, Aufbewahrung

der Zellen ca. 1 ml PBS 4% bei 4 °C

Modifizierte Zellseparation mit Trennsäulen

- a) die in 4% PFA-fixierte oder in PBS/BSA-aufgenommene Monocytenfraktion (incl. Tumorzellen) zentrifugieren (10 min, 900 rpm), Überstand verwerfen
- b) die Säule mit 3ml PABB absättigen (PABB von oben mit Pipette auf die Säule geben)
- c) das Pellet in PBS/BSA schrittweise verdünnen, anfangen mit 10 ml im PP-Röhrchen, dann durchmischen, anschließend nach und nach auf die Säule geben, dabei durchlaufende Suspension als Negativkontrolle auffangen.
- d) mit Hilfe einer 10 ml Einwegspritze und eines darauf installierten Dreiwegehahns blasenfrei ca. 3 ml PBS/BSA von unten durch die Säule spülen, so daß Zellen erneut die Säule passieren können. Wiederum durchlaufende Suspension als Negativkontrolle auffangen.
- e) die Säule mit weiteren 5-10 ml PBS/BSA nach und nach spülen und in der Negativkontrolle auffangen (alle Negativzellen sollten jetzt abgespült, die Positivzellen dagegen in der Säule hängengeblieben sein. Zellen, die durch Anti-Zytokeratin-Antikörper und magnetisches Mikrobead magnetisierbar sind, bleiben in der Säule hängen)
- f) bei langsamer Durchlaufgeschwindigkeit die Säule erneut von unten mit PBS/BSA durchspülen
- g) die Säule vorsichtig aus dem Magneten nehmen und die erste Positivfraktion (+) mit 5-6 ml PBS/BSA aus der Säule spülen in ein PP-Röhrchen

- h) erneut die Säule mit 3-4 ml PBS/BSA füllen und mit einem Stempel durch die Säule drücken. Man erhält die zweite Positivfraktion (++), die in einem zweiten PP-Röhrchen aufgefangen wird.

In der Regel finden sich im Vergleich zu der ersten Positivfraktion (+) in der (++) Fraktion nur noch Tumorzellen und nur noch einzelne Leukozyten, Erythrozyten, Urothelzellen.

- i) zentrifugieren (10 min, 900 rpm), Überstand werfen,

6. Cytospins für die Antikörper-Färbung

- a) Pellets aus 5 PBS/BSA verdünnen. Je nach Umfang des Pellets in 400 μ l bis 2000 μ l
- b) 200 μ l verdünnte Positiv-Fraktionen mittels Zytro-zentrifuge ebenfalls auf Objektträger aufbringen. Negativ(-)-Kontrolle ebenfalls auf einen Objektträger zentrifugieren
- c) Zentrifugationsbedingungen:
8 min (set time 8/enter), 400 Umdrehungen = 2 x g
(set speed 40/enter, start) zentrifugieren
- d) Zellen auf Objektträger mit 30 μ l PFA pro Spot für ca. 20 min in Feuchtekammer fixieren. Anschließend abklopfen, ggf. kühl aufbewahren

7. Färbung der Zytokeratine

Reagenzien:

- 4 % PFA (Paraformaldehyd: 37 % Formalin + PBS 1:10 verdünnen)
- 0.1 % Triton X 100 (in PBS)

- 10% AB-Serum (5 ml AB-Serum Biotest AG + 50 μ l BSA-c + 45 ml PBS/BSA)
- 1 % PBS/BSA
- 1. Antikörper: Maus-Anti-Zytokeratin-Antikörper Arbeitskonzentration 1:50 (in PABB) (C7, C20 oder PAN)
- sekundärer Antikörper: Anti-Maus Alexa 594-Antikörper Arbeitskonzentration 1:100 (in PABB)
- Isotypenkontrolle in 10% AB-Serum

evtl. bei Protatakarzinompatienten:

1. Antikörper: Anti-PSA-Antikörper Arbeitskonzentration 1:50 (in PABB)
 - sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit Alexa 488-Antikörper Arbeitskonzentration 1:100 (in PABB)
- a) die fixierten Pellets auf dem Objektträger (s. letzter Punkt vom Cytospin) mit 30 μ l 0.1 % Triton X 100 pro Spin für 10 min permeabilisieren, anschließend abklopfen
- b) mit 30 μ l 10% PABB-Serum für 20 min blockieren, abklopfen
- c) 15 μ l verdünnter 1. Antikörper (Maus Anti-Zytokeratin-Antikörper: gilt für die Spezifitäten C7, C20, PAN) pro Spin für 30 min, anschließend abklopfen
- d) waschen mit 30 μ l PBS/BSA pro Spin für 10 min, abklopfen, Vorgang zweimal wiederholen
- e) 15 μ l verdünnter sekundärer Antikörper (Anti-Maus Alexa 594, Antikörper) pro Spin für 30 min abklopfen
- f) waschen mit 30 μ l PBS/BSA pro Spin für 10 min, abklopfen, Vorgang zweimal wiederholen

- V. Herstellung von Zellsuspensionen aus solidem humanem Tumorgewebe (zum Beispiel eines Mamma- oder Prostatakarzinoms)

Reagenzien:

Invasionsmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
1% (v/v) 2 mM L-Glutamin
1% (v/v) Antibiotic/antimycotic Solution
0,1% (w/v) bovines Rinderserumalbumin (BSA) im Invasionsmedium
Trypanblau-Lösung (0,4 % (Gew/Vol) Fa. Sigma, Deisenhofen

Durchführung:

Gewebestückchen von frisch operierten Mammakarzinomen, benignen Brusterkrankungen bzw. Prostatakarzinomen werden vom Operateur in sterile Röhrchen mit Standardmedium gegeben und bis zur Disaggregation (spätestens 4 h nach der Entnahme) auf Eis gestellt. Von jedem Gewebestück wird ca. die Hälfte für die spätere Expressionsanalyse) abgetrennt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die andere Hälfte wird mit einer mechanischen Methode disaggregiert. Dazu wird eine Medimachine (Firma Dako, Hamburg) verwendet. Zur Disaggregation wird das Mammagewebe mit einem Skalpell in 3 bis 10 mm² große Stücke geschnitten und zusammen mit 1,5 ml Invasionsmedium in ein Medicon gegeben. Das Gewebe wird dann innerhalb der Medimachine in 2 bis 3 min zu einer Zellsuspension disaggregiert, die Einzelzellen und Zellaggregate (Zellhaufen) von bis zu ca. 30 Zellen enthält. Die Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt und die Lebendzellzahl mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionstests bestimmt, der darauf beruht, daß bei lebenden Zellen bestimmte Farbstoffe (z.B. Trypanblau) nicht in das Zellinnere gelangen können, während tote Zellen sich mit dem betreffenden Farbstoff anfärben (Kaltenbach et al., 1958; Lindl und Bauer, 1994).

Nach Durchführung der so dargestellten Zellisolierungen erfolgt nun die Genotypisierung der isolierten Zellhaufen zum Zwecke ihrer Zuordnung zu Bereichen im Primärtumor mittels PCR.

Im folgenden wird beispielhaft die Nukleinsäureisolierung aus verschiedenen verwendeten Zellmaterialien beschrieben.

1. DNA von aus peripherem Blut isolierten Zellhaufen und mikrodisektierten entparafinierten fixierten-gefärbten Tumorgewebeschnitten

Auf einem inversen Lichtmikroskop (Leitz Diavert) werden die PSA und Cytokeratin positiven Tumorzellen und Tumorzellkluster sowie nicht positive Monozyten als Negativkontrolle (bzw. Referenz für die LOH-Berechnung) mit einer sterilen feinen Nadel mikrodisektiert und in je 1,5 ml sterile Reaktionsgefäße (Eppendorf Biopure) überführt. Bei kleinen multifokalen Tumorearealen können nach der gleichen Vorgehensweise auch verschiedene Foci multifokaler Tumore aus bereits gefärbten und pathologisch untersuchten Schnitten einzelner Areale vom Objektträger mikrodisektiert werden. Je nach Zellzahl (ca. 50-1000 Zellen) werden die Zellen in 10-200 µl LTEPuffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und mit 1-20 µl Proteinase K (>600mAU/ml) im Thermoblock oder Wasserbad bei 50-56 °C für 1-10 h inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend werden die Proben für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Daraufhin werden die Proben mit 99,8% Ethanol p.a. (Roth) auf eine 70%ige Lösung eingestellt. Nach kurzem vortexen werden die Proben bei 15000 rpm für 20 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wird anschließend in 10-200 µl LTE-Puffer oder doppelt destillierten Wasser resuspendiert, bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert (Rehydratisierung) und bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C tiefgefroren.

2. DNA aus konserviertem Tumorgewebe mit mono- und multifokalen Herden

Die DNA-Isolierung aus frischem sowie formalinfixiertem bzw. in Paraffin eingebettetem Gewebe der Primärtumore einer oder mehrerer Foci erfolgt nach den Protokollen des kommerziell erhältlichen QIAamp DNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) oder einem vergleichbaren System anderer Hersteller. Dieser Kit enthält QIAamp DNA Mini Spin Columns (Säulen), Proteinase K für den proteolytischen Verdau des Gewebes, die Lysispuffer AL und ATL, die Ethanol enthaltenden Waschpuffer AW1 und AW2 und den Elutionspuffer AE. Frisches Gewebe eines Primärtumores wird vor der Gewebelysis mechanisch mit einem Skalpell oder dafür vorgesehene Gewebezerkleinerungsmaschinen (z.B. Medimaschine, DA-KO) aufgeschlossen. Für die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wird vor der eigentlichen DNA-Isolierung eine Entparaffinierung mit 100% Xylol vorgenommen. Dazu werden die Proben zunächst in 1 ml Xylol in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem handelsüblichen Thermoblock auf 70 °C für 1 h inkubiert. Anschließend für 3 min zentrifugiert der Überstand verworfen und dieser Prozess zwei Mal wiederholt. Anschließend wird das Gewebe drei Mal mit 99,8 % Ethanol (Roth) gewaschen, anschließend getrocknet und in den Lysispuffer überführt. Danach erfolgt die Isolation nach den Protokollen der Hersteller.

Die DNA-Isolierung aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut erfolgt mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den bekannten Protokollen oder vergleichbaren Verfahren anderer Hersteller.

Wenn nötig wird das Vollblut für 10 min mit Puffer AL und Proteinase K zur Lyse der Zellen bei 54 °C im Thermoblock inkubiert, anschließend mit Ethanol versetzt und das Gemisch auf die Säule (QIAamp DNA Mini Spin Columns) gegeben. Die Proben werden mit AW1 und anschließend mit AW2 gewaschen und mit dem Elutionspuffer AE eluiert. Die DNA-

Lösungen werden zur Konzentrationsbestimmung photometrisch bei 260, 280 und 320 nm gemessen auf 10 ng/ μ l eingestellt und bei -20 °C eingefroren.

3. Isolierung RNA von aus peripherem Blut isolierten Zellen

Auf einem inversen Lichtmikroskop (Leitz Diavert) werden die PSA- und Cytokeratin-positiven Tumorzellen und Tumorzellhaufen mit einer sterilen feinen Nadel mikrodisssektiert und in ein 1,5 ml steriles Reaktionsgefäß (Eppendorf Biopure) überführt. Die RNA-Isolierung wird strikt nach den Protokollen des RNeasy Purification Kit for total RNA miniprepARATION (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt, bestehend aus: RNeasy Mini Spin Columns, Collection tubes 1,5 und 2 ml, Puffer RTL, Puffer RWI, Puffer RPE und RNase-freiem Wasser).

Im folgenden wird nun beispielhaft die erfindungsgemäße Detektion karzinom-spezifischer, genetischer Veränderungen und mRNA-Expressionen mittels Mikrosatelliten-PCR, Multiplex Mikrosatelliten-PCR und TaqManTM RT-PCR beschrieben.

4. Mikrosatelliten- und Multiplex-Mikrosatelliten-PCR

Insgesamt werden drei Multiplex-PCRs verwendet, die aus den Mikrosatellitenkombinationen Nr. 1: D7S522 D8S258, D16S400, Nr.2: NEFL, D13S153, D17S855 und Nr.3 D10S541, D16S402, D16S422 bestehen. Das Prinzip dieser PCRs beruht auf der Coamplifikation verschiedener DNA-Abschnitte in einem Reaktionsgefäß. Dabei wurden die Primersequenzen derart gesetzt, dass in der kapillarelektrophoretischen Trennung keine Überschneidungen der Längen der Amplifikationsprodukte auftreten. Alle Primer sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die bei 488 nm angeregt werden (siehe Tabelle 3). Alle anderen handelsüblichen Fluoreszenzmarkierungen sind ebenfalls anwendbar. Des weiteren

wurden die PCR-Reaktionsbedingungen für 10 CA-repeats innerhalb des EGFR-Gens und ein CA-repeat innerhalb des p53 Gens neu entwickelt und optimiert.

Alle PCRs können in handelsüblichen 0,2 ml oder 0,5 ml Reaktionsgefäßen oder in 96-Well-Platten verschiedener Hersteller (z.B. Eppendorf, Hamburg) auf einem Eppendorf Mastercycler, Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg), einem Gene AmpR PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) oder einem handelsüblichen, vergleichbaren Thermocycler anderer Hersteller durchgeführt werden.

Das Reaktionsvolumen kann 12 μ l bis 100 μ l betragen. Das PCR Reaktionsgemisch besteht aus 5U/100 μ l AmpliTaq GoldTM oder einer qualitativ vergleichbaren Polymerase und (bewährt haben sich hot start Polymerasen) 1 x GeneAmp^R dNTP, 2 mM MgCl₂, 30pM von jedem Primer, 200 μ M GeneAmp^R buffer (alle Reagenzien von PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und 500 pg bis 200 ng genomischer DNA. Für die PCR werden folgende Temperaturgradienten gefahren. Begonnen wird mit einem 95 °C Denaturierungsschritt, gefolgt von 30-45 Zyklen bestehend aus einem 95 °C Denaturierungsschritt für 30s, einem 56 °C-62 °C Annealingschritt (je nach Primer, alle Multiplex-PCRs werden einheitlich mit 56 °C durchgeführt) und einem Elongationsschritt bei 72 °C. Nach diesen Zyklen wird ein 72 °C Extensionsschritt für 7 min angeschlossen und anschließend die Proben bei 4 °C bis zur Probenentnahme gekühlt aufbewahrt.

Für den Mikrosatelliten p53 werden die gleichen Reaktionsbedingungen und Thermozyklen benutzt wie für die Multiplex-PCRs (siehe Tabelle 2).

Die Mikrosatellitenanalyse erfolgt auf den Kapillarelektrophoresegeräten (four colorlaser-induced fluorescence capillary electrophoresis system) ABI Prism 310 Gene-

tic Analyzer oder ABI 3700 DNA Analyser (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) oder einen vergleichbaren Genetic Analyzer anderer Hersteller. Als Trennmedium dienen die Polymere POP4, POP5 und POP6 die für die entsprechenden Geräte geeignet sind. Als Längenstandard dient Genescan-500TM TAMRA 500 oder ein vergleichbarer Längenstandard, der für die genannten Kapillarelektrophoresegeräte geeignet ist. Die Analyse und Auswertung erfolgte mit der Genescan Software.

Verwendete

<u>Reagenzien:</u>	<u>Volumen:</u>
Wasser	bis zu 25pl
10*PCR Puffer II (PE)	2,5pf
25mM MgCl ₂ Lösung (PE)	2 µl
dATP, 10 mM (PE)	0,25 µl
dCTP, 10 mM (PE)	0,25 µl
dGTP, 10 mM (PE)	0,25 µl
dTTP, 10 mM (PE)	0,25 µl
5'-3'-Primer 10 µM	0,5 µl 1
3'-5'-Primer 10 µM	0,5 µl
AmpliTag Gold (PE) oder	0,25 µl
AmpliTag DNA Polymerase	0,25 µl
Total:	25 µl

Thermocycler: PE 9700,

Gefäße: 0,2 ml Gefäße jeder Hersteller, für PCR-Maschinen geeignet

Tabelle 2:

Temperaturzyklen für die Mikrosatelliten-PCR:

Für D7S2429, BB1/2, CAII, D7S2550, CAIII, CAIV, CAVI,
D7S2467, D7 D7S2552:

95 °C - 4 Min.

62 °C - 1 Min.

72 °C - 1 Min.

31 Zyklen

95 °C - 1 Min.

62 °C - 1 Min.

72 °C - 1 Min.

72 °C - 8 Min.

4 °C - unendlich

Für D7S494:

95°C - 4 Min.

58 °C - 1 Min.

68 °C - 1 Min.

31 Zyklen

95 °C - 1 Min.

58 °C - 1 Min.

68 °C - 1 Min.

68 °C - 8 Min.

4 °C - unendlich

Für D7S499:

95 °C - 4 Min.

56 °C - 1 Min.

68 °C - 1 Min.

31 Zyklen

95 °C - 1 Min.

56 °C - 1 Min.

68 °C - 1 Min.

68 °C - 8 Min.

4 °C -unendlich

Tabelle 3:

Probenvorbereitung ABI Prism 3700: Fragmentanalyse (GeneScan)

Pipettierschema:

Reagenzien:	Volumen:
Längen-Standard f. Kapillarelektrophoren, z.B. GeneScan Tamra 500	0,5 μ l
HPLC-Wasser oder Formamid	18,5 μ l
PCR-Produkt	1 μ l

Standard: GeneScan-500 TAMRA Size Standard PE Biosystems

Proben denaturieren: im Thermoblock für 2 Min. bei 80-90 °C

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer, Genloci und Fragmentlänge des PCR-Produktes

Primerlocus	Primersequenzen	Cytogenetische Lokalisation	Fragmentlänge [bp]
D7S522	5'-Fam-GCA GGA CAT GAG ATG ACT GA-3' 5'-GTT ATG CCA CTC CCT CAC AC-3'	7q31.1	116-126
BB1+2 (EGFR)	5'-Fam-GTT TGA AGA ATT TGA GCC AAC C-3' 5'-TTC TTC TGC ACA CTT GGC AC-3'	7p12	114-128
CAII (EGFR)	5'-Fam-CT CGA GGT CTC ATC CTC TTT CC-3' GCA GAG GTG CAC AAA GGA GTAA-3'	7p12	164-168
CAIII (EGFR)	5'-Fam-AG GCC CAC AGA GGA GAT AAC AG-3' 5'-CAG GTG TGG TAG ATG CCA AAG A-3'	7p12	117-121
CAIV (EGFR)	5'-Fam-GC AAC TTA TCC AAA CCC TGA CC-3' 5'-AGA GTG GAC TAG GAA ATG CTA GGA G-3'	7p12	184-204
CAIV (EGFR)	5'-Fam-AG TTC CTG ACT GGG AAT TCG AT-3' 5'-TTG GCC AAA TTA CAC ACC TTT G-3'	7p12	151-155
D7S2550 (EGFR)	5'-Fam-TTC CAT TTG TCT CGG TT-3' 5'-AGT CTC CTC GTC TCA CAC CT-3'	7p12	256-278
D7S2429 (EGFR)	5'-Fam-CAG TGC TGG AGT TGT TCA AG-3' 5'-CTG GGA GTC AAG TGT TTT GG-3'	7p12	170-180
D7S2467 (EGFR)	5'-Fam-TGC TAA GTC TTG ATT TTG CC-3' 5'-AAC GGT CAT CTG TGT TCG-3'	7p12	238-244
D7S478 (EGFR)	5'-Fam-GGT GTT TGT GTC ATT ACG CT-3' 5'-TTT GCT GTA GAG GAT GCA AT-3'	7p12	312-314
D7S670 (EGFR)	5'-Fam-TTC GGG CTC TCT GTT ATA AA3' 5'-CCG AAG CAG GAT TTT ATT TC-3'	7p12	136-152
D8S258	5'-Fam-AGC TGC CAG GAA TCA ACT GAG AG-3' 5'-GAT GCT CAC ATA AAG GAG GGA GG-3'	8p22	216-230
NEFL	5'-Fam-CC AAT ACC TGC AGT AGT GCC - 3' 5'-GAG CTG CTT AAC ACA TAG AA - 3'	8p21	97-105
D10S541 (PTEN)	5'-Fam-CAC CAC AGA CAT CTC ACA ACC-3' 5'-CCA GTG AAT AGT TCA GGG ATG G	10q14.2	153-175
D13S153 (Rb1)	5'-Fam-AG GGT TAT GTA TAA CCG ACT CC-3' 5'-Fam-GTC TAA GCC CTC GAG TTG TGG-3'	13q14.2	170-190
D16S400	5'-Fam-GGT TCA CAA TTG GAC AGT AT-3' 5'-GAA CCC TCC ATG CTG ACA TT-3'	16q22.2-23.1	165-179
D16S402	5'-Fam-GT ACC CAT GTA CCC CCA ATA-3' 5'-CAA AGC ACC ACA TAG ACT AA-3'	16q24.2	110-120
D16S422	5'-Joe-GAG AGG AAG GTG GAA ATA CA-3' 5'-GTT TAG CAG AAT GAG AAT AT-3'	16q24.2	105-129
P53	5'-Fam-AAG AAA TTC CCA CTG CCA CTC-3' 5'-ATC CCC TGA GGG ATA CTA TTC-3'	17p13.1	132-148
D17S855 (BRCA1)	5'-Fam-GG ATG GCC TTT TAG AAA GTG G3' 5'-ACA CAG ACT TGT CCT ACT GCC-3'	17q21	139-153

5. TaqMan® RT-PCR

Auf einem inversen Lichtmikroskop (Leitz Diavert) werden die PSA- und Cytokeratin-positiven Tumorzellen und Tumorzellhaufen mit einer sterilen feinen Nadel mikrodisssektiert und in ein 1,5 ml steriles Reaktionsgefäß (Eppendorf Biopure) überführt. Die RNA-Isolierung wird strikt nach den Protokollen des RNeasy purification kit for total RNA miniprepARATION (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt, bestehend aus: RNeasy Mini Spin Columns, Collection tubes 1,5 und 2 ml, Puffer RTL, Puffer RW1, Puffer RPE und RNase-freiem Wasser). Die RNA wird in einer two-tube-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Dies wird genau nach den Protokollen für den Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen beträgt 20 µl. Das Reaktionsgemisch besteht aus RT 1 x Puffer, dNTPs (je 0,5 mM) 1 µM Oligo-dT primer, 10 Einheiten RNase Inhibitor, 4 Einheiten Omniscript Reverse Transcriptase und RNase-freiem Wasser. Für die RT-PCR werden die RNA-Proben zunächst bei 65 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

Die RT-PCR kann auf einem Eppendorf Mastercycler, Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg), einem Gene Amp R PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) oder einem handelsüblichen, vergleichbaren Thermocycler anderer Hersteller durchgeführt werden. Die PCR besteht aus einem 37 °C Inkubationsschritt für 60 min gefolgt von einem 93 °C Denaturierungsschritt. Die RNA-Isolierungen und die RT-PCR können des weiteren mit allen handelsüblichen Verfahren durchgeführt werden, die für geringe Gewebemengen geeignet sind, z.B. dem ExpressDirect™ Kit For mRNA Capture And RT System For RT-PCR (Pierce Rockford).

Die Echtzeit PCR kann auf einem ABI Prism 9700 HT Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) in 96 oder 384 well Platten, abgedichtet mit einer optisch durchlässigen Folie (ABI PRISM™ optical adhesive

covers, Foster City), durchgeführt werden. Die Reaktionen werden üblicherweise in Doppel- oder Dreifachbestimmungen nach den Vorschriften für TaqMan-PCR nach PE Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch besteht aus einem TaqMan R Universal PCR Master Mix, plus je

90 nM der beiden PSA spezifischen Primer (forward 5'-TTCACCCTCAGAAGGTGACCA- TaqMan-Sonde (5'-CCAGCGTCCAGCACACAGCATGA). Der Temperaturgradient besteht aus einem anfänglichen 50 °C Inkubationsschritt für 2 min gefolgt von einem 95 °C Denaturierungsschritt für 10 min; anschließend werden 40-60 Zyklen gefahren, die aus einem 95 °C Denaturierungsschritt für 15 sec und einem 60 °C Amplifikationsschritt für 1 min bestehen. Der Lauf und die Auswertung erfolgten mit der SDS-Software (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Primer und TaqMan-Sonde sowie der TaqMan Mastermix können von verschiedenen Anbietern genutzt werden.

Als Positivkontrolle und zur Etablierung der TaqMan-PCR wurde RNA aus Zellen einer LNCaP Zellkultur isoliert, die dafür bekannt ist, dass sie PSA exprimieren. Als Negativkontrolle dienen Lymphozyten von Frauen.

6. Beispiele für die Zuordnung der zirkulierenden Zellen zu Bereichen des Primärtumors

a) Untersuchung einzelner Patienten

Bei einzelnen Patienten wurde nach dem beschriebenen Verfahren die Mikrosatellitenmarker in der DNA von aus dem peripheren Blut isolierten PSA-positiven epithelialen Zellen und aus einzelnen Foci des Primärtumors bestimmt. Die Mikrosatellitenmarker wurden nach dem Protokoll wie unter 4. beschrieben aus DNA bestimmt, die nach den Protokollen 1 und 2 gewonnen wurde. Die Prostatapräparate wurden vor der DNA-Isolierung nach dem von Schmid et al. (Schmid HP et

al., Akt Urologie 1993) beschriebenen Verfahren in Großflächenschnitten im Abstand von 3 bis 4 mm systematisch aufgearbeitet und eine detaillierte kartographische Erfassung der Karzinomausdehnung wurde erstellt. Hierbei wurde nach Farbmarkierung des operativen Schnittrandes die Tumorgröße, die Lage des Tumors im Verhältnis zur Pseudokapsel der Prostata (Infiltration oder Penetration der Kapsel) und das Heranreichen oder Überschreiten der operativen Schnittländer in der durch das Karzinom dokumentiert. Histologisch gesichertes Tumorgewebe wurde dann aus dem paraffineingebetteten Material des Primärtumors gewonnen. Die Fig. 7 zeigt eine sogenannte Tumorlandkarte in der die Entnahmeorte markiert sind.

Das Alter der Patienten, das Stadium und histopathologische Parameter des Tumors sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Nr.	Alter	PT ('92)	N	Grading	Gleason-Score	PSA, prä-op (ng/ml)
1	67	2c	0	2a	7	9,9
2	66	3c	1	3b	9	10,6
3	69	2c	0	2a	6	6,9
4	67	3b	0	2b	7	9,5
5	63	3a	0	3a	8	7,8
6	61	3a	0	2b	7	22,6

Tabelle 5: Vergleich der genetischen Alterationen zwischen verschiedenen Foci eines Primärtumores und den aus Blut isolierten zirkulierenden Tumor-Zellhaufen

Loci	Patient Nr.1 (39)			Patient Nr.2 (85)			Patient Nr.3 (50)		
	Zirkulierende Zellen	Focus 1	Focus 2	Zirkulierende Zellen	Focus 1	Focus 2	Zirkulierende Zellen	Focus 1	Focus 2
D17S855	hom.	Hom.	Hom.	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
NEFL	hom.	Hom.	Hom.	LOH	LOH	LOH	hom.	hom.	hom.
D13S153	hom.	Hom.	Hom.	Kein LOH	Kein LOH	LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH
D16S402	LOH A2	LOH A2	LOH A1	Kein LOH	Kein LOH	LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH
D16S422	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH
D10S541	LOH	LOH	LOH	hom.	hom.	hom.	Kein LOH	LOH	Kein LOH
D7S522	LOH	LOH	Kein LOH	hom.	hom.	hom.	Kein LOH	Kein LOH	Kein LOH
D16S400	hom.	Hom.	Hom.	LOH	LOH	Kein LOH	hom.	hom.	hom.
D8S258	LOH A1	LOH A1	LOH A2	hom.	hom.	hom.	Kein LOH	LOH	Kein LOH

Loci	Patient Nr.4 (54)			Patient Nr.5 (117)			Patient Nr.6 (97)		
	Zirkulierende Zellen	Focus 1	Focus 2	Zirkulierende Zellen	Focus 1	Focus 2	Zirkulierende Zellen	Focus 1	Focus 2
D17S855	kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	kein LOH	kein LOH	kein LOH	kein LOH	kein LOH	kein LOH
NEFL	kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	hom.	hom.	hom.	hom.	hom.	hom.
D13S153	LOH	LOH	Kein LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
D16S402	kein LOH	Kein LOH	Kein LOH	LOH	LOH	LOH	Kein LOH	LOH	Kein LOH
D16S422	hom.	Hom.	Hom.	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
D10S541	hom.	Hom.	Hom.	LOH	LOH	LOH	Kein LOH	LOH	Kein LOH
D7S522	hom.	Hom.	Hom.	hom.	hom.	hom.	hom.	hom.	hom.
D16S400	hom.	Hom.	Hom.	LOH	LOH	kein LOH	hom.	hom.	hom.
D8S258	LOH	LOH	LOH	hom.	hom.	hom.	Kein LOH	LOH	Kein LOH

hom. = Homozygot
LOH = Loss of Heterozygosity

A1 = Allel 1
A2 = Allel 2

Damit ist nachgewiesen, daß mittels der Analyse von Mikrosatelliten DNS zirkulierende Zellen bestimmten Foci eines Primärtumors unmittelbar zugewiesen werden können.

Damit ist es auch möglich, durch Untersuchung der im Blut zirkulierenden Tumorzellhaufen zu ermitteln, in welchem Stadium sich der Primärtumor befindet bzw. welchen Verlauf die Erkrankung bzw. eine therapeutische Maßnahme nimmt.

b) Untersuchung eines Patientenkollektivs

Weiterhin wurde die DNA des organbegrenzt-wachsenden Prostatakarzinoms von 204 Patienten mittels der dargestellten Verfahren zur Bestimmung von Veränderungen in polymorphen DNS-Sequenzen untersucht. Eine Kopplung zwischen der Veränderung in einem polymorphen Marker und einem Funktionsgen konnte gezeigt werden. Es wurde daher in Prostatakarzinomen die Marker D7S522, p 53, D8S522, NEFL, D10S541, D13S153, D16S400, D16S402, D16S422, D17S855 aus 6 chromosomalen Lokalisationen untersucht. Mit Hilfe einer non-parametrischen multivariaten statistischen Methode (hierarchic-agglomerative cluster analysis) wurden Klassen von Tumoren mit spezifischen MS Mutationen gebildet („pattern recognition“) (Fig. 2).

Durch die mathematische Clusteranalyse wurden 3 Subgruppen mit bis zu 4 spezifischen DNS-Veränderungen herausgearbeitet: 1. p53, D16S402 oder D16S400 (n=10); 2. D8S258 und/oder NEFL, D13S153, D16S402 (n=9) 3. D10S541, D7S522, D13S153, D16S400 (n=11). Eine eher seltene Kombination aus p53 und D13S153 (n=6) wurde in Tumoren Patienten mit signifikant früherem Erkrankungsalter im Vergleich zu allen anderen Patienten gefunden (\bar{X} =59 Jahre; STD=4; \bar{X} =64 Jahre; STD=4; p=0.02). Die meisten Rezidive wurde hingegen in der Subgruppe 3 gefunden (4/9).

Man kann zusammenfassend sagen, dass multiple genetische Entwicklungs- und Progressionswege für das Prostatakarzinom existieren müssen, die sich mit Hilfe der Kombination der untersuchten Marker indizieren lassen (Fig. 3). Es ist festzuhalten, dass die Tumorprogression mit einer absoluten Zunahme an DNS-Veränderungen in polymorphen Sequenzen einher geht. Trotzdem läßt sich an Hand der vorliegenden Studienergebnisse eine Hierarchie der Genmutationen ableiten, die zur Ausbildung klinisch bestimmbarer Subtypen des Prostatakarzinoms führen (Fig. 3). So kann man bei p53, D10S541 und NEFL bzw. D8S258 von Initiationsmutationen sprechen und bei denen auf Chromosom 16q und 13q von Verstärkermutationen, die nicht primär eine Tumorprogression einleiten.

Dieser Ansatz wurde auf den Vergleich der Veränderungen von polymorphen DNS-Sequenzen zwischen dem Primärtumor und den zirkulierenden Zellen an 24 Patienten übertragen (Fig. 4). Dabei wurde gefunden, daß die Freisetzung von Tumorzellen aus dem primären Tumor mit bestimmten Veränderungen in den polymorphen DNS-Sequenzen verbunden ist (Fig. 5). Der Cluster mit dem Marker D10S541, der mit einer frühen Metastasierung in Zusammenhang steht wird auch bevorzugt in den Zellhaufen des Blutes gefunden. Dagegen stehen Veränderungen in dem Marker D8S258 einer Aussaat der Zellen in das periphere Blut entgegen (Fig. 6). Die Auswertung des krankheitsfreien Intervalls zeigt, daß eine Veränderung dieses polymorphen DNS-Markers mit einer guten Prognose assoziiert ist (Fig. 6).

- c) Beispiele für den Nachweis eines Prostatakarzinoms über den Nachweis von Zellclustern im peripheren Blut der Patienten und die Vorhersage des Ergebnisses einer Prostatabiopsie

Bei 19 Patienten wurden vor transrektal-sonographisch gesteuerte Prostatabiopsie je 50 ml Blut entnommen. Nach dem hier beschriebenen Verfahren wurden Zytokeratin- und

PSA-positive intakte kleinzellige Zellhaufen isoliert.

Bei 8 Patienten ergab die Biopsie ein Prostatakarzinom (PCa) und bei 11 benignes Prostatagewebe (BPH). Die Patienten wiesen folgende Serum-PSA und Prostatavolumina auf:

Charakteristika		PCa-Patienten (n=8)	BPH-Patienten (n=11)
t-PSA	Mittelwert (Stdabw.)	9,0 (6,5)	9,6 (4,3)
	Median	6,9	8,6
F/t-PSA	Mittelwert (Stdabw.)	0,14 (0,07)	0,15 (0,09)
	Median	0,12	0,12
Prostatavol.	Mittelwert (Stdabw.)	45 ml (18)	58 ml (15)
	Median	46 ml	60 ml
CK+/PSA+-Zellhaufen		6/8	3/11

Während t-PSA und f/t-PSA im Serum keine sichere Vorhersage des Biopsieergebnisses erlaubten, ermöglichte die Untersuchung der Zellhaufen eine korrekte Vorhersage in 14 von 19 der untersuchten Patienten (Effizienz der Untersuchung 74%).

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung von Primärtumoren bzw. einzelner Bereiche von Primärtumoren, dadurch gekennzeichnet, daß aus Probenmaterial darin befindliche Zellhaufen von Tumorzellen isoliert bzw. angereichert und anschließend genetische Veränderungen der isolierten Zellhaufen analysiert werden.
2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als Probenmaterial Zellkulturen, Blut, Urin, Nippleaspiratflüssigkeit der weiblichen Brust oder Gewebeproben aus Primärtumoren verwendet werden.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß polymorphe DNS des Primärtumors oder einzelner Bereiche des Primärtumors bzw. Veränderungen hiervon erfaßt und mit entsprechender polymorpher DNS der Zellhaufen bzw. Änderungen hiervon verglichen werden.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS der polymorphen Sequenzen D7S522, D8S133, D8S258, D8S298, D8S265, NEFL, D10S541, D10S1765, D10S579, D13S153, D16S400, D16S402, D16S413, D16S422, p53, BB1, BB2, CAII, CAIII, CAIV, CAV und/oder D17S855 analysiert werden.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die polymorphe DNS vor der Analyse vervielfältigt wird.
6. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die polymorphe DNS jeweils dreier polymorpher Sequenzen D7S522, D8S258, D16S400 oder NEFL, D13S153, D17S855 oder D10S541, D16S402, D16S422 gemeinsam analysiert und/oder vervielfältigt wird.
7. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die polymorphe DNS vor der Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird.
8. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die polymorphen DNS unter Verwendung der folgenden Primerpaare vervielfältigt wird:
GCAGGACATGAGATGACTGA und GTTATGCCACTCCCTCACAC (für D7S522);
GTTTGAAGAATTTGAGCCAACC und TTCTTCTGCACACTTGGCAC (für BB1+2);
CTCGAGGTCTCATECTCTTTCC und GCAGAGGTGCACAAAGGAGTAA (für CAII);
AGGCCCACAGAGGAGATAACAG und CAGGTGTGGTAGATGCCAAAGA (für CAIII);
GCAACTTATCCAAACCCTGACC und AGAGTGGACTAGGAAATGCTAGGAG (CAIV);
AGTTCTGACTGGGAATTCGAT und TTGGCCAAATTACACACCTTTG (für CAV);
TTCCATTTGTCTCGGTT und AGTCTCCTCGTCTCACACCT (für D7S2550);
CAGTGCTGGAGTTGTTCAAG und CTGGGAGTCAAGTGTTTTGG (für

D7S2429);
TGCTAAGTCTTGATTTTGCC und AACGGTCATCTGTGTTCG (für
D7S2467);
GGTGTFTTGTGTCATTACGCT und TTTGCTGTAGAGGATGCAAT (für
D7S478);
TTCGGGCTCTCTGTTATAAA und CCGAAGCAGGATTTTATTTTC (für
D7S670);
AGCTGCCAGGAATCAACTGAGAG und GATGCTCACATAAAGGAGGGAGG (für
D8S258);
CCAATACCTGCAGTAGTGCC und GAGCTGCTTAACACATAGGG (für NEFL);
CACCACAGACATCTCACAACC und CCAGTGAATAGTTCAGGGATGG (für
D10S541);
AGGGTTATGTATAACCGACTCC und GTCTAAGCCCTCGAGTTGTGG (für
D13S153);
GGTTCACAATTGGACAGTAT und GAACCCTCCATGCTGACATT (für
D16S400);
GTACCCATGTACCCCAATA und CAAAGCACCACATAGACTAA (für
D16S402);
GAGAGGAAGGTGGAAATACA und GTTTAGCAGAATGAGAATAT (für
D16S422);
AATAAATTCCCACTGCCACTC und ATCCCCTGAGGGATACTATTC (für
p53);
GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG und ACACAGACTTGTCTACTGCC (für
D17S855).

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die erzeugten vervielfältigten DNS-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese getrennt und analysiert werden.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Isolierung bzw. Anreicherung von Tumorzellen aus dem Probenmaterial Cytokeratin-positive und/oder für gewebsspezifische Proteine positive epitheliale

Zellen isoliert bzw. angereichert werden.

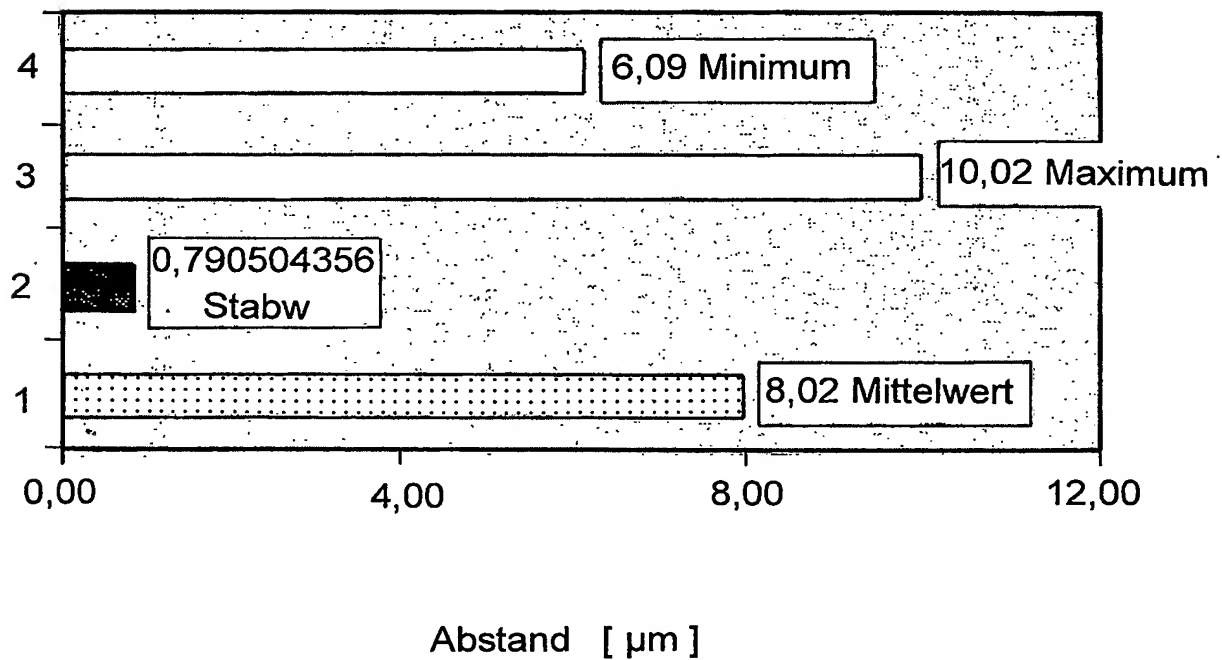
11. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, aus dem Probenmaterial, gegebenenfalls nach Homogenisierung in einem Lösungsmittel, mittels Dichtegradientenzentrifugation epitheliale Zellen angereichert werden und von den angereicherten Zellen mittels immunomagnetischer Zellisolierung Cytokeratin-positive und/oder für gewebsspezifische Proteine positive Zellhaufen abgetrennt werden.
12. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als Medium für die Dichtegradientenzentrifugation ein hyperosmolares Medium verwendet wird.
13. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als hyperosmolarer Puffer mindestens eines der folgenden Medien 13,8 % (Gew/Vol) Natriumdiatrizoat und 8 % (Gew/Vol) Dextran 500 in H₂O (Polymorphprep) oder 13 % (Gew/Vol) Nycodenz, 0,58 % (Gew/Vol) NaCl und 5 mM Tricine-NaOH pH 7,4 in H₂O (NycoPrep) verwendet wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die genetischen Veränderungen der isolierten Zellhaufen mittels Clusteranalyse analysiert werden.
15. Verwendung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur molekularen Charakterisierung.

risierung von Tumoren oder Tumorbereichen oder zur Bestimmung der Klonalität von aus Probenmaterial isolierten Zellhaufen sowie zum Nachweis eines Tumors zur Bestimmung des Tumorstadiums, des Metastasierungspotentials, der Therapiebedürftigkeit, der Therapierbarkeit eines Tumors oder eines Bereiches eines Tumors sowie der Verlaufsprognose der Erkrankung bzw. einer Therapie.

16. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zum Nachweis und/oder zur Charakterisierung von Tumoren oder Tumorbereichen von Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Kolonkarzinomen, Magenkarzinomen, Prostatakarzinomen und/oder Blasenkarzinomen.

1/8

PAP Zellendurchmesser Übersicht

**FIG.1A**

2/8

DAPI Zellendurchmesser Übersicht

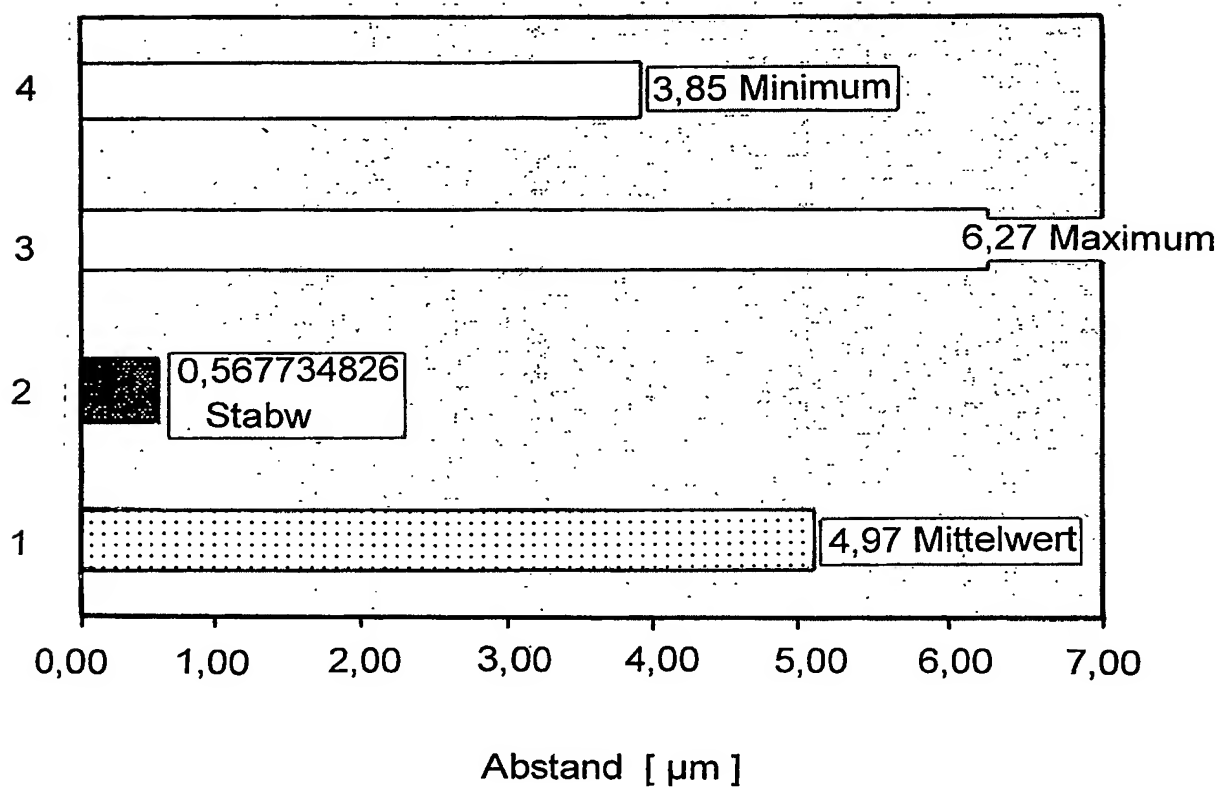
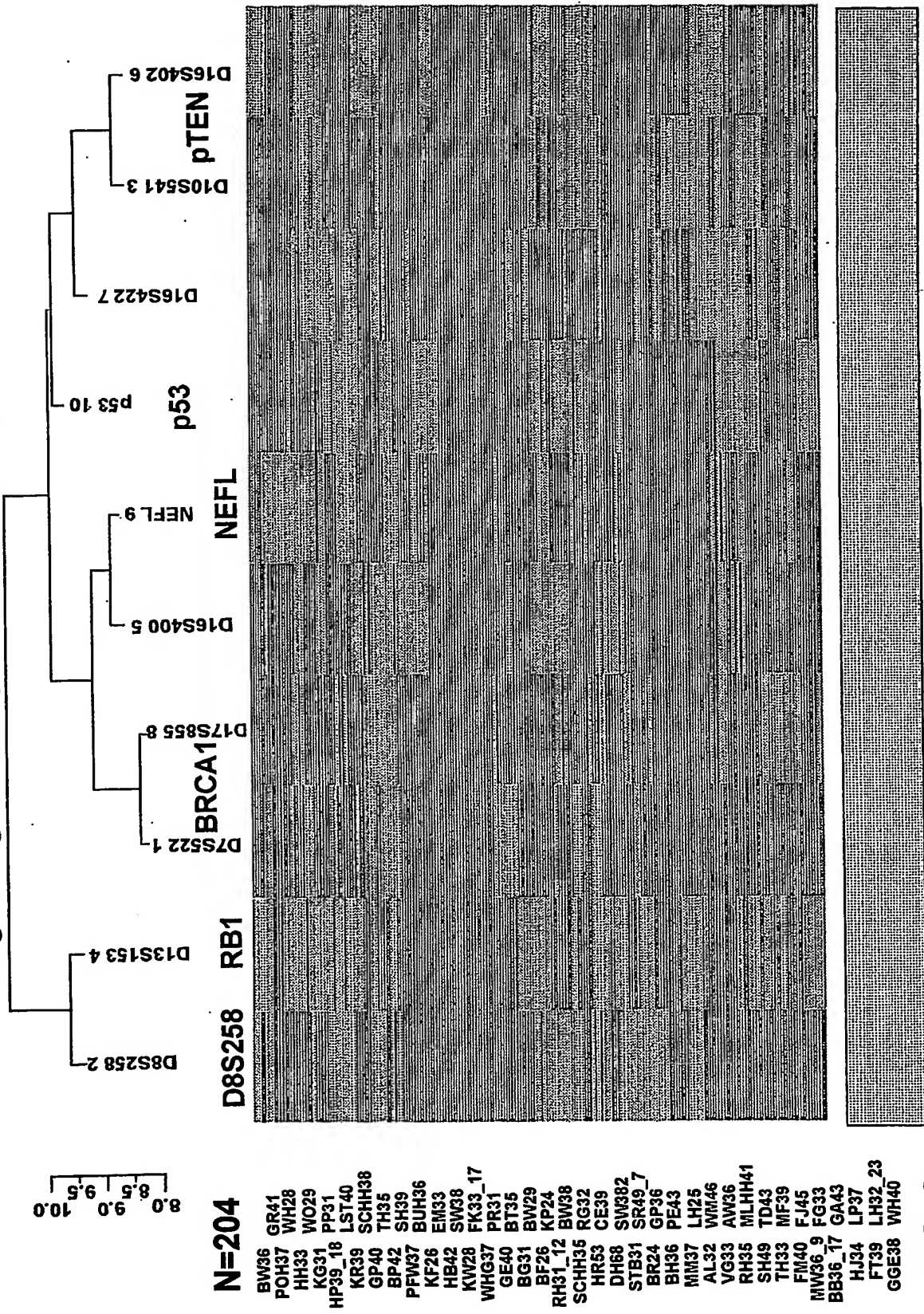


FIG.1B

Clusteranalyse der Mikrosatellitenveränderungen von
organbegrenzten primären Prostatakarzinomen



Observations

FIG.2

Multiple Genetische Progressionswege des Prostatakarzinoms

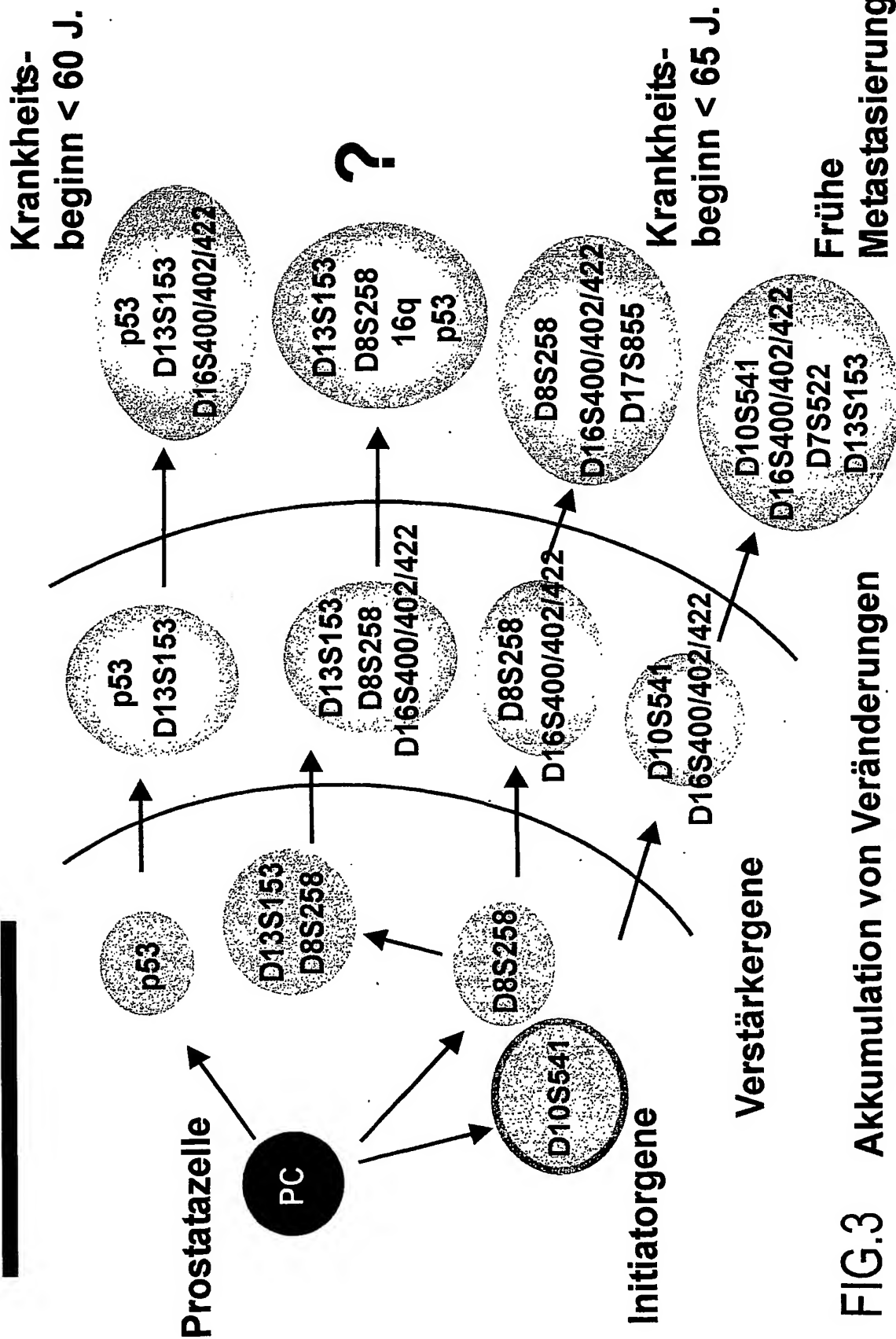


FIG.3 Akkumulation von Veränderungen

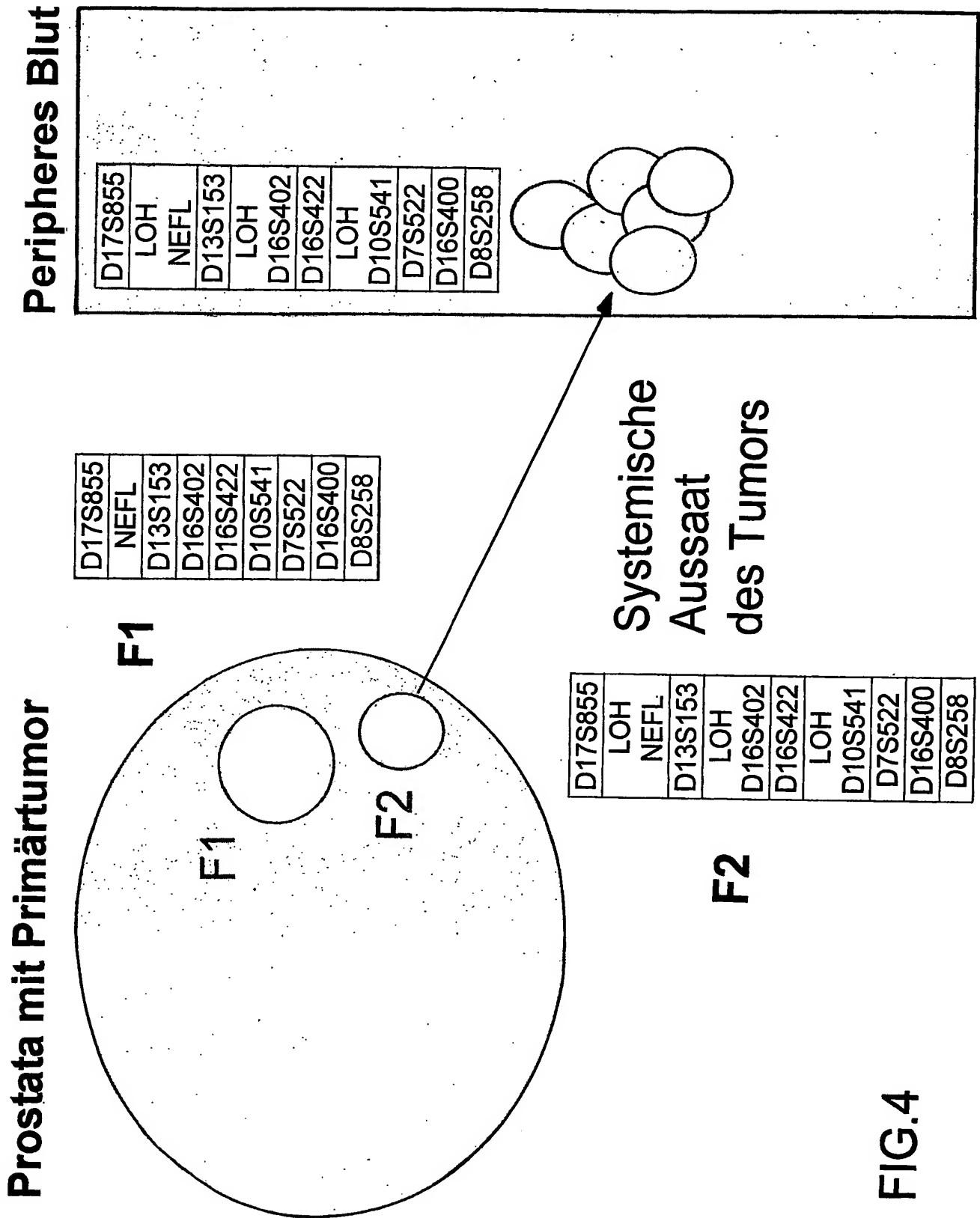


FIG.4

Genomische Veränderungen der zirkulierenden Krebszellen

Two way hierarchical clustering
 Data: RERLOHneuauswertungCluster[x.CC,]
 Variables: 30CC 1 ... 117CC
 Number of Variables: 24 Observables: 9
 Model: hclust (hierarchical clustering)
 Method: compact (complete linkage)
 Distance Metric: euclidean
 Data scaled No

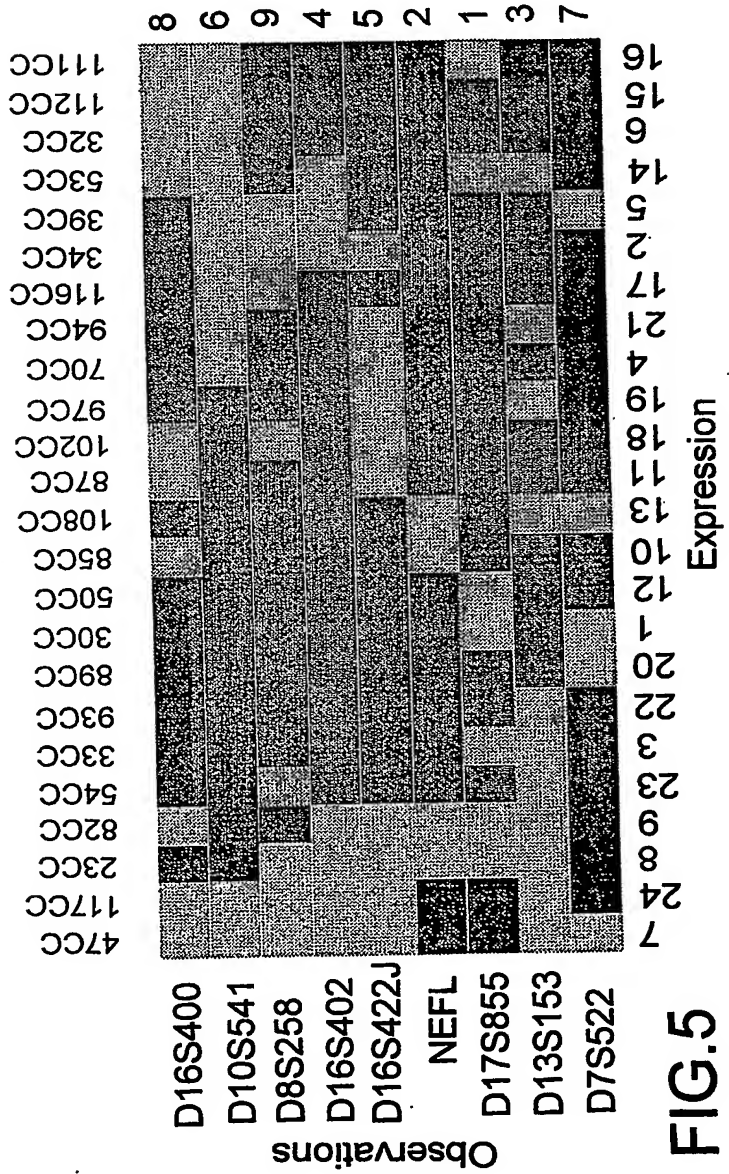
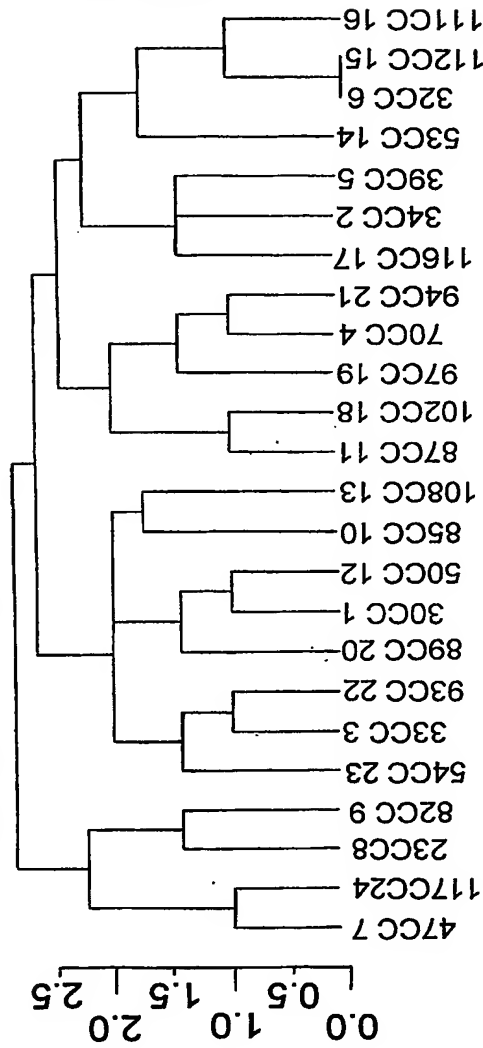
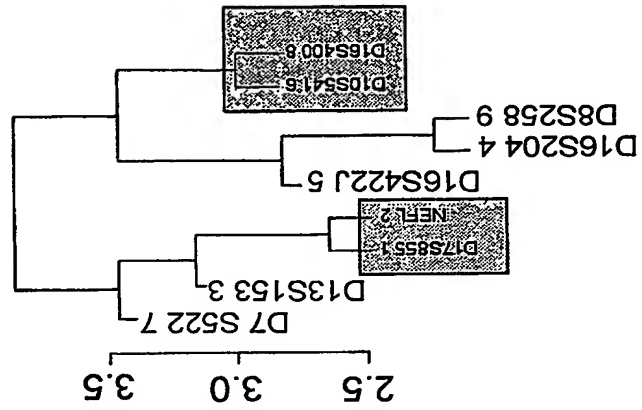
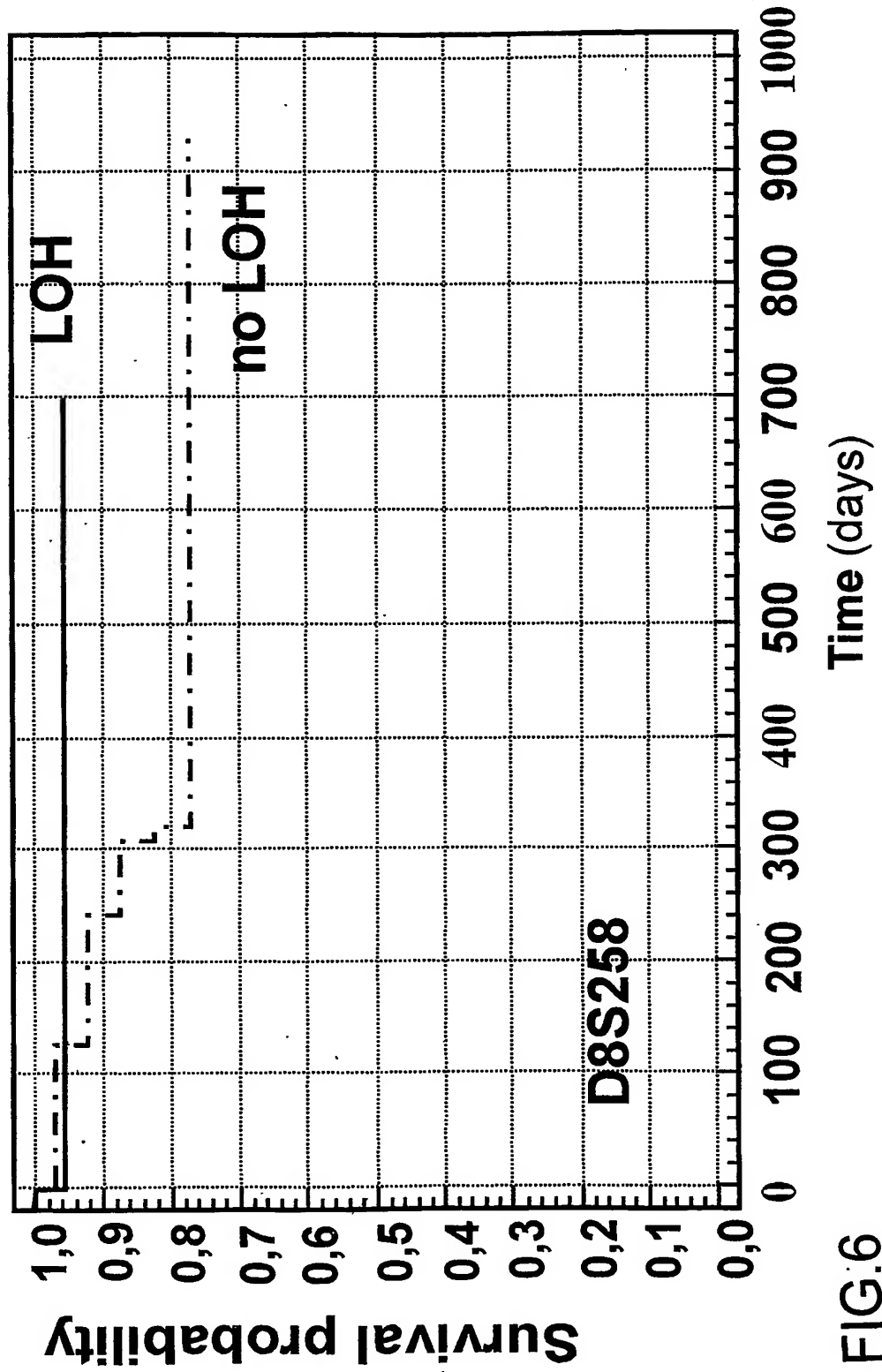


FIG.5



Krankheitsfreies Überleben der Prostatakarzinompatienten und Veränderungen auf Chromosom 8p



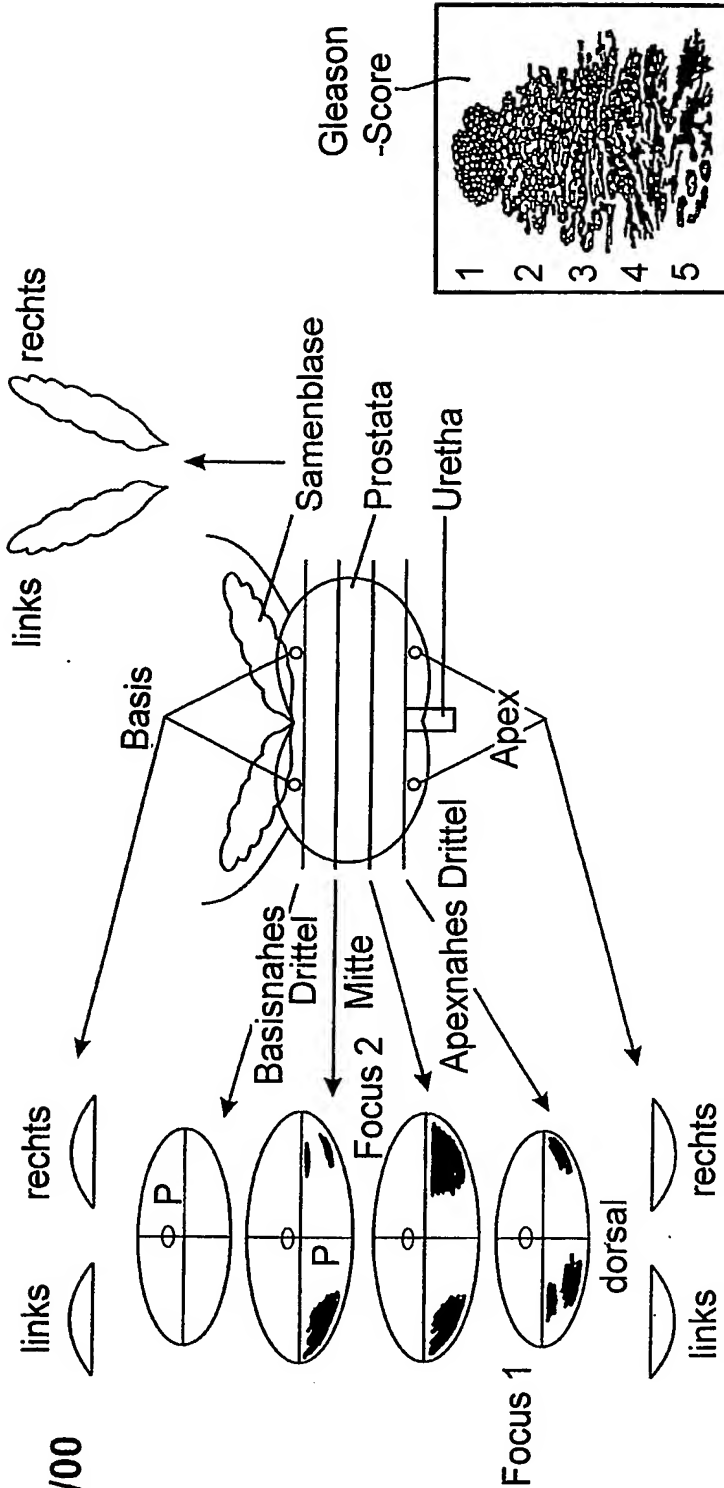


FIG.7

<p>P Prostatiscche Intraepitheliale Neoplasie (PIN)</p> <p>Adenokarzinom</p> <p>Kapselinvasion</p> <p>Extraprostatetische Ausbreitung</p> <p>positiver chirurg Schnitttrand</p>	<p>Differenzierungsmuster</p> <p><input type="checkbox"/> hochdifferenziert 0</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> wenig differenziert 1</p> <p><input type="checkbox"/> kribriform 2</p> <p><input type="checkbox"/> solid 3</p>	<p>Helpap Kernatypie</p> <p><input type="checkbox"/> gering 0</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> mäßig 1</p> <p><input type="checkbox"/> stark 2</p>
<p>pT: 2b</p>	<p>la = 0 lb = 1 IIa = 2 IIb = 3 IIIa = 4 IIIb = 5</p>	<p>IIIa = 4 IIIb = 5</p>
<p>Gleason Score</p> <p>3 + 3 = 6</p>	<p>Malignitäts Grading (Helpap):</p> <p>IIa</p>	<p>IIa</p>

Landkarte eines Prostatakarzinoms

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.